



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ENTEROKOK İZOLATLARINDA *vanA*, *vanB* ve *vanC*  
GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Hazırlayan  
Bio. Mümin SARGIN

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

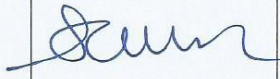


ÇANAKKALE-2017

## TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program Adı : Tıbbi Mikrobiyoloji  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji  
Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Mümin SARGIN  
Tez Başlığı : Enterokok İzolatlarında *vanA*, *vanB* ve *vanC* Genlerinin Belirlenmesi  
Sınav Yeri : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi.  
Sınav Tarihi : 02.02.2017

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Sınav Jürisi

Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Ahmet ÜNVER	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.	
<b>Sınav Jüri Üyeleri</b> <b>(Unvan ve Adları)</b>		
Prof. Dr. Mehmet ÜNLÜ	Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.	
Doç. Dr. Alper AKÇALI	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.	

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans Tezi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .08./...05/...2017 tarih ve .15/4.... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

## THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name : Medical Microbiology

Programme Level : Master of Science (X) Doctor of Philosophy ( )

Department : Medical Microbiology


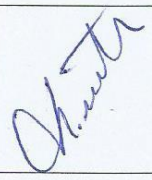

Student Name and Surname: Mümin SARGIN

Title of the Thesis : Investigations of *VanA*, *VanB* and *VanC* Genes in Enterococcus isolates

Examination Place : Canakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Medicine.

Examination Date : 02/02/2017

We have examined the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Prof. Dr. Ahmet ÜNVER	Canakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine Department of Medical Microbiology	
<b>Members of Examination Jury (Titles and Names)</b>		
Prof. Dr. Mehmet ÜNLÜ	Balıkesir University Faculty of Medicine Department of Medical Microbiology	
Doç. Dr. Alper AKÇALI	Canakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine Department of Medical Microbiology	

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Sciences Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated 08..05.2017 and numbered ..15/4.....

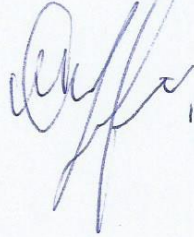
## BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8'de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

Tarih: 08/05/17

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Mümin SARGIN

İmza:



## ÖZET

Enterokokların hastane ve toplum kökenli enfeksiyon etkenleri arasındaki önemi hızla artmaktadır. Bu etkenlerde gelişen vankomisin direnci ve vankomisine dirençli türlerin birçok antibiyotiğe de dirençli olması, enterokokal enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir. Vankomisin direnci ile ilişkili genlerin belirlenmesi bu önemli direncin özelliklerini daha iyi anlamaya ve etkin tedavi ve mücadele yöntemlerine yardımcı olmaktadır. Bu çalışmada vankomisin direnci ve tür özellikleri farklı enterokok izolatlarında vankomisin direnciyle ilişkili önemli genlerden *vanA*, *VanB* ve *VanC*'nin PCR ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma materyali olarak, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Haziran 2013 – Mart 2014 tarihleri arasında Vitek-2 Compact ile tanımlanmış 91'i (%45,5) (biri vankomisin dirençli) *E. faecalis*, 102'si (%51) (66'sı vankomisin dirençli) *E. faecium*, beşi (%2,5) *E. gallinarum* ve ikisi (%1) *E. avium*'dan oluşan 200 izolat kullanıldı. Bakterilerden DNA izolasyonu ve özgün genleri amplifiye eden PCR gerçekleştirildi. Toplamda 97 (%48,5) *vanA*, dört (%2) *vanC*, iki (%1) *vanA+vanC* direnç genleri pozitif izolat tespit edilirken, 97 (%48,5) izolat direnç genleri bakımından negatif olarak belirlendi. Doksan *E. faecalis* izolatından 19'u (%21,1) *vanA* pozitif olarak tespit edilirken, 71 (%78,9) suş ise negatif olarak belirlendi. Otuz altı *E. faecium* suşundan 16 tanesi (%44,4) *vanA* pozitif bulunurken 20 izolat (%55,6) ise negatif olarak belirlendi. Beş *E. gallinarum* izolatından dördü (%80) *vanC* pozitif olarak tespit edilirken, bir (%20) suşun *vanC* negatif olduğu bulundu. İki *E. avium* izolatı analiz edilen tüm direnç genleri açısından negatif olarak ortaya konuldu. Vitek-2 tarafından VR *E. faecium* olarak tanımlanmış 66 suşun 61'i (%92,4) *vanA*, ikisi (%3) *vanA+vanC* olarak tespit edilirken, üç (%4,6) izolat negatif olarak belirlendi.

Bu araştırmada izole edilen hem VRE hem de VSE suşlarında belirlenen yüksek düzeyde direnç geni varlığı, başta *vanA*, *vanB* ve *vanC* olmak üzere direnç ilişkili genlerin dikkatle izlenmesinin etkin kontrol ve önleme yöntemleri için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın enterokokların direnç özelliklerini ve epidemiyolojisini daha iyi anlamaya ve ilgili genlerin belirlenmesi şeklindeki tanısal desteğin önemini daha iyi kavramaya katkı sunması beklenmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Enterokok, vankomisin, PCR, *vanA*, *vanB*, *vanC*.

## ABSTRACT

### Investigations of *vanA*, *vanB* and *vanC* Genes in Enterococcus Isolates

Enterococci has increasing importance in both community and hospital acquired infections. The development of resistance to vancomycin leading to multiple drug resistance is complicating the treatment of enterococcal infections. Identification of genes associated with vancomycin resistance helps better understanding of resistance properties and effective treatment and control strategies. The present study aimed to determine the *vanA*, *VanB* and *VanC*, important genes associated with vancomycin resistance, in enterococcal isolates. For this purpose, 200 Enterococci strains isolated from surveillance and clinical samples in the Microbiology Laboratory of Çanakkale Onsekiz Mart University Hospital were analyzed. These strains, isolated between June 2013 – March 2014 and identified by Vitek-2 Compact system, consisted of 91 (45.5%) *E. faecalis* (one vancomycin resistant), 102 (51%) *E. faecium* (66 vancomycin resistant), five (2.5%) *E. gallinarum* and two (1%) *E. avium*. Bacterial DNA isolation and PCR targeting to *vanA*, *VanB* ve *VanC* genes were performed. Total of 97 (48,5%) *vanA*, four (2%) *vanC* and two (1%) *vanA+vanC* PCR positive isolates were determined and 97 (48.5%) isolates were found to be negative for resistance genes. Of the ninety *E. faecalis* isolates, 19 (21.1%) were found to be positive for *vanA* and 71 (78.9%) for negative. Among 36 *E. faecium* strains, 16 (44.4%) were positive for *vanA* and 20 (55.6%) were negative. Four out of five *E. gallinarum* isolates (80%) were identified as *vanC*, while a strain was found to be *vanC* negative (20%). Two *E. avium* strains were negative for all resistance genes analyzed. Among 66 isolates identified as VR *E. faecium* by Vitek-2, 61 (92.4%) and 2 (3%) were determined as *vanA* and *vanA+vanC*, respectively while three (4.5%) strains were found to be PCR negative.

The existence of high level of resistance genes in both VRE and VSE strains isolated in this study suggests that careful monitoring of resistance-related genes, particularly *vanA*, *vanB* and *vanC*, is essential for effective treatment, control and preventive measures. The results of this study may help better understand resistance properties of enterococci, epidemiology of enterococcal infections and importance of resistance gene determination in diagnostic contribution.

**Keywords:** Enterococci, vancomycin, PCR, *vanA*, *vanB*, *vanC*.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, tecrübeleri ve bilgisiyle bana yön veren, tez çalışmam boyunca karşıma çıkan sorun ve sorularımı yanıtlamamda ayrıca zorlukları aşmamda bana yardımcı olan danışmanım sayın Prof. Dr. Ahmet ÜNVER'e,

Tıbbi Mikrobiyoloji dalındaki eğitimim ve bu alanda gelişimime büyük katkıları olan ayrıca emeklerini boşa çıkartmamak adına değerli hocalarım sayın Doç. Dr. Müşerref OTKUN ve sayın Doç. Dr. Alper AKÇALI'ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam esnasında yardımlarını gördüğüm Uzm. Ahmet VURAL ve Yrd. Doç. Dr. S.Zeynep TEKİN'e, desteğini hiç esirgemeyen umutsuzluğa düştüğümde umut kaynağım olan arkadaşım Berrin AYBEY'e, bilgilerine her daim başvurduğum çalışmamda desteklerini esirgemeyen bölüm arkadaşlarım Uzm. Bio. Nimet KARADELİ, Uzm. Bio. Narçın MURİQİ ve Uzm. Hem. Derya AVCI'ya, çalışma hayatım ve tezimde her konuda yardımlarını esirgemeyen Uzm. Bio Ümit KARADELİ'ye, destekleriyle yanımda olan arkadaşlarım Hüseyin Resul Ay ve Uzm. Bio. Sinem KULAKSIZ'a teşekkür ederim.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi personellerine çalışmam boyunca gösterdikleri hoşgörüyü teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emeklerini asla ödeyemeyeceğim, hayatıma en büyük desteği veren ve yeri kaplayan, maddi, manevi, her anımda yanımda olup, düştüğümde ayağa kalkmamı öğreten sevgili annem Ayşe SARGIN ve babam Nejdet SARGIN'a yaptıklarının karşılığı olarak yerini asla doldurmayacak teşekkürlerimi sunarım.

ÇANAKKALE, Ocak 2017

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU .....	i
THESIS APPROVAL FORM.....	ii
BEYAN FORMU .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ .....	x
TABLolar .....	xii
RESİMLER.....	xiii
ŞEKİLLER.....	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Sınıflandırma Tarihçesi.....	4
2.2. Mikrobiyolojik Özellikler .....	6
2.2.1. Görünüm ve Boyanma Özellikleri.....	6
2.2.2. Üreme Özellikleri ve Fizyolojik Karakterleri.....	6
2.2.3. Hücre Duvarı Yapısı ve Antijenik Özellikleri.....	9
2.3. Epidemiyoloji .....	9
2.4. Enterokok Türlerinin Özellikleri .....	11
2.5. Direnç Mekanizması .....	13
2.5.1. <i>vanA</i> Tipi Direnç.....	14
2.5.2. <i>vanB</i> Tipi Direnç.....	15
2.5.3. <i>vanC</i> Tipi Direnç .....	16
2.6. Enterokoklarda Glikopeptid Direncinin Saptanması İçin Kullanılan Yöntemler Yöntemler .....	16
2.6.1. MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	17
2.6.2. Disk Difüzyon Testi.....	18
2.6.3. Agar Sınır Değer Testleri .....	18
2.6.4. Genotipik Testler .....	18
2.7. Vankomisine Dirençli Enterokok Saptama Yöntemleri .....	19
2.7.1. Enterokoklarda Glikopeptid Direncinin Aktarım Yolları .....	20



2.7.2. Glikopeptid Direncinin Enterokoklardan Diğer Patojenlere Hızlı Yayılımı	21
2.8. Enterokok Enfeksiyonları	22
2.8.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları	22
2.8.2. Endokardit	23
2.8.3. Yara ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları	23
2.8.4. İntraabdominal ve Pelvik Enfeksiyonlar	23
2.9. Tedavi	24
2.9.1. Vankomisin	24
2.9.2. Teikoplanin	26
2.10. Enterokok Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol Önlemleri	26
2.10.1. Vankomisin Akılcı Kullanımı	27
2.10.2. Personel Eğitim Programları	28
2.10.3. VRE'nin Tespit, Kontrol ve Raporlanmasında Mikrobiyoloji Laboratuvarının Rolü	28
2.10.4. Enfeksiyon Kontrol Önlemlerinin Kurallara Uygun Uygulanması	28
2.10.5. Sürveyans Kültürleri	29
2.10.6. Gastrointestinal Kolonizasyonu Ortadan Kaldırmak İçin Girişimler	30
2.11. Enterokok Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	30
2.12. Enterokoklarda Antimikrobiyal Direnç	33
2.12.1. Doğal (İntrensek) Direnç	34
2.12.1.1. Beta - Laktam Direnci	34
2.12.1.2. Aminoglikozid Direnci	35
2.12.2. Edinsel (Kazanılmış) Direnç	35
2.12.2.1. Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Kazanılmış Direnç	35
2.12.2.2. Aminoglikozid Antibiyotiklerine Kazanılmış Yüksek Düzeyde Direnç	35
2.12.2.3. Glikopeptid Antibiyotiklere Karşı Direnç	36
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	37
3.1. Kullanılan Gereçler	37
3.2. Materyal	38
3.3. Yöntemler	39
a) Katalaz Testi	39
b) PYR Testi (L-pyrrolidonyl-B-naphthylamide Hidroliz Testi)	39
c) Safra Eskülin Testi Deneyi	39
d) Tuz Tolerans Testi (%6,5'lük NaCl Buymon)	39

3.3.1. Direnç Genlerinin Belirlenmesi .....	40
3.3.1.1. DNA İzolasyonu .....	40
3.3.1.2. <i>vanA</i> , <i>vanB</i> ve <i>vanC</i> Genlerinin Amplifikasyonu.....	41
3.3.1.3. Agaroz Jel Elektroforez ve Jel Görüntüleme.....	43
4. BULGULAR .....	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	45
6. KAYNAKLAR.....	55
7. EKLER.....	71
Ek. 1. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ciltli Tez Yazım Kontrol Listesi.....	71
Ek. 2. Etik Kurul Onay Formu .....	72
8. ÖZGEÇMİŞ .....	73

## KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

BHI: Brain Heart Infusion Broth

BE: Bile-Esculine

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CAA: Sefaleksim-Aztreonam-Arabinoz Agar

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CNA: Columbia Kolistin-Nalidiksik Azid Agar

CNISP: Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance System

ETA: Endo Trakeal Aspirasyon

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GİS: Gastrointestinal Sistem

GRE: Glycopeptide Resistant Enterococci

HICPAC: Hospital Infection Control Practices Advisory Committee

LAPase: Leucine Aminopeptidase

LTA: Lipoteikoik Asit

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization / Time of Flight Mass Spectrometer

MGP: Methyl-alpha-D-Glucopyranoside

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

MRSA: Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*

MRSE: Metisiline Dirençli *Staphylococcus epidermidis*

NHSN: National Healthcare Safety Network

NNIS: National Nosocomial Infection Surveillance System

PCR: Polimerase Chain Reaction

PEA: Fenil Etil Alkol Agar

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

PYR: Pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide

PYRase: Pyrrolidonyl Arylamidase

RAPD-PCR: Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA - Randomly Amplified Polimorphic DNA

RT-PCR: Reverse Transcription PCR

SARA-PCR: Specific and Random Amplification PCR

TBE: Tris/Borate/EDTA Tamponu

tDNA-PCR: tRNA-Intergenik Length Polimorfizm Analizi

UHESA: Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı

VRE: Vankomisine Dirençli Enterokok

VSE: Vankomisine Duyarlı Enterokok

VRSA: Vankomisine Dirençli *S. aureus*

YDAD: Yüksek Düzeyde Aminoglikozid Direnci



## TABLULAR

<b>Tablo 1.</b> <i>Streptococcaceae</i> sınıflandırması .....	4
<b>Tablo 2.</b> Kabul görmüş ve yeni katılmış enterokok türleri .....	5
<b>Tablo 3.</b> Kullanılan primerler ve dizileri.....	41
<b>Tablo 4.</b> Analiz edilen enterokokların tür, direnç durumu ve izole edildiği materyale göre dağılımı .....	43
<b>Tablo 5.</b> Enterokok izolatlarının <i>vanA</i> , <i>vanB</i> ve <i>vanC</i> PCR sonuçları .....	44



## RESİMLER

- Resim 1.** Koyun Kanlı Agar (%5) besiyerinde enterokok üremesi ve bakteri kolonileri..... 8
- Resim 2.** EUCAST Enterokokların vankomisin için okuma örnekleri ile zon çaplarına göre duyarlılık raporlamaları ..... 17
- Resim 3.** *vanA* ve *vanC* PCR ürünlerinin gösterildiği temsili resim..... 44



## ŞEKİLLER

Şekil 1. Vankomisinin hücre duvarına etki mekanizması .....	13
Şekil 2. Transpozon Tn1546'nın <i>vanA</i> kümesi.....	15
Şekil 3. <i>vanB</i> gen kümesi.....	15
Şekil 4. <i>vanC</i> gen kümesi .....	16



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanlık tarihi boyunca toplumu etkileyen enfeksiyon hastalıkları, en önemli problemlerden biri olmuştur. Eski dönemlerde enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların zararlı etkilerine karşı çeşitli kimyasallar, kokulu çubuklar ve boyalar kullanılarak tedaviler oluşturulmaya çalışılmıştır. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi amacıyla, antibiyotik çağının başlangıcı olarak kabul edilen penisilinin keşfinden sonra çok sayıda antimikrobiyal ilaç üretilmiş ve kullanılmıştır. Enfeksiyon hastalıklarının çoğu antimikrobiyal ajanlar ile tedavi edilebilmiştir. Ancak antibiyotiklerin hatalı kullanımının sonucunda tedavilerde kullanılacak olan her yeni keşfedilen antibiyotiğe kısa sürede direnç gelişmiştir. Hastane florasına hakim olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve enterokoklar gibi hastane enfeksiyonları bakımından izolasyonu sık olan bu patojenlerde çoklu ilaç direnci bulunan suşlar kendini göstermeye başlamıştır. Çoklu ilaç direnci gösteren suşlar kendilerine önceleri hastanelerde yer bulsalar da sonraki zamanlarda toplumda da görülmeye başlamıştır. Klasik antibiyotik tedavisine cevap vermeyen suşların sebep olduğu hastane veya toplum kökenli yeni enfeksiyonlar, yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmuştur (Lewis, 1990; Çetinkaya ve ark, 2000; Spelman, 2002; Zerr ve ark, 2005; Singh ve ark, 2006).

Enterokoklar intestinal sistem ile beraber vajinal floranın üyesidirler ve uzun süre hastalık oluşturma özellikleri düşük olarak değerlendirilmişlerdir. Enterokoklar, antimikrobiyallerin hastanelerde sıklıkla ve hatalı kullanımı nedeniyle beta-laktam, aminoglikozid ve glikopeptit türevi olan antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir. Yatan hastalarda enterokokların glikopeptidlere direnç geliştirmesi ve kullanılan ek kemoterapötiklerin de hastaya ait intestinal floranın bozulmasına yol açıp, genel dolaşımına dahil olarak iç kökenli bakteriyemi ve endokardit oluşmasında rol oynarlar. Böyle hastalarda antimikrobiyal ajanların kullanılmasıyla meydana gelecek olan kontamine dışkılar ile temas, ortamda bulunan diğer hastalara da taşınarak dış kaynaklı hastane enfeksiyonlarına yol açıp hastalığın yayılmasında, ölümlerin meydana gelmesine neden olmuşlardır (Lewis, 1990; Çetinkaya ve ark, 2000).

1984 yılından önce *Streptococcus* cinsi içinde değerlendirilen enterokoklar, 1984 yılına gelindiğinde *Enterococcus* adı ile farklı bir cins olarak tanımlanmıştır. *Enterococcus* cinsi üyeleri, katalaz pozitif, fakültatif anaerob olup hareketsiz (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum* dışında) ve mikroskop altında tek tek, çift olarak ya da



kısa zincirler biçiminde Gram pozitif koklar olarak görünürler (Teixeira ve ark, 2011; UMS, 2014).

Enterokoklar; çevresel ortamları hariç tutarsak, insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde (GİS) yaygın olarak bulunurlar. Bir gram dışkıda  $10^5$ - $10^7$ CFU/gr'den daha fazla sayıda enterokok bulunmasından dolayı, enterokoklar bağırsak florasının önemli bakteri grupları arasındadır. İnsan GİS'inde kommensal yaşayan enterokoklar, fırsatçı patojen olup insanda çeşitli enfeksiyonların oluşmasında rol oynamaktadır. Genellikle enfekte ettikleri bölgeler; idrar yolu, kan, endokard, yanık yeri yaraları, ameliyat yeri yaraları, safra yolu, kateter ve abdomen olarak belirtilmiştir. Enterokoklar çevre ortamında ve barsak floramızda bulunmasından dolayı, enfeksiyon etkeni olup olmadığının değerlendirilmesinde dikkatli olunmalıdır (UMS, 2014).

Hastalık etkeni enterokoklar, antimikrobiyal ajanlara karşı direnç kazanma özellikleri ve dirence sebep olan yapılarını hem kendi cinslerine hem de stafilokok gibi diğer bakteri türlerine aktarabilirler. Biyofilm oluşturma özellikleri sayesinde canlı ve cansız yüzeylerde kolayca kolonize olabilirler. Antibiotiklere karşı kolay direnç geliştirme ve biyofilm oluşturmaları nedeniyle, antibiyotiklerin etkisinden kolaylıkla kaçabilirler (UMS, 2014).

Yaklaşık 40 yıldır hastane kaynaklı enfeksiyonlarda, mortalite ve morbidite oranını artırması, çoklu antibiyotik direnci göstermesi, enterokokların tıbbi önemini belirgin şekilde artırmıştır. Özellikle enterokokların tedavisinde etkili bir şekilde kullanılan vankomisin antibiyotiğine son yıllarda geliştirdiği direnç, hastane enfeksiyonları açısından oldukça önemli hale gelmiştir (UMS, 2014).

Vankomisin, ilk kez 1952 yılında *Amycolatopsis (Streptomyces) orientalis* adlı bir organizmadan izole edilmiştir. Penisiline dirençli stafilokoklar da dahil olmak üzere, Gram pozitif organizmalara karşı aktif olan vankomisin, ilk glikopeptid türü antibiyotiktir (Anderson ve ark, 1961). Vankomisin elde edildikten hemen sonra klinik kullanıma büyük beklentilerle girmiştir. O dönemlerde "Mississippi çamuru" olarak adlandırılan vankomisinin (05865 bileşiği) saf şekilde elde edilememiş olması ve fazla yan etki göstermesi antibiyotik kullanımını sınırlandırmıştır (Levine, 2006).

Vankomisin kullanımı, 1980'li yılların başında giderek artmaya başlamıştır. 1984 yılına gelindiğinde, Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık 2000 kg olan tüketim, 1996 yılında 11200 kg seviyesine ulaşmıştır (Kirst ve ark, 1998).

Vankomisine dirençli enterokokların (VRE), hastanelerde ortaya çıkması ve artan salgınlara ilişkin raporlar, enterokok ilişkili enfeksiyonların görülme sıklığı ve yayılmasında farkındalık yaratmıştır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde, VRE oranı 1989 yılında %0,3'lerden 10 yılın sonrasında 1999 yılına gelindiğinde, %25'i geçmiştir (UMS, 2014). Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan büyük çoğunlukla izole edilen enterokoklar hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonu etkenleri arasında ikinci, yara enfeksiyonu etkenleri arasında ise üçüncü sırada yer almaktadır (UMS, 2014).

Yoğun bakım ünitelerinde bulunan vakaların yarısında hastane ilişkili enterokok enfeksiyonu ile ilgili problemler yaşanmaktadır. EARSS verilerine göre Avrupa ülkelerinde, nozokomiyal enterokok bakteremilerde VRE görülme oranı %5-45, arasında değişkenlik gösterirken (Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe, 2015), ülkemizdeki VRE görülme oranları %0,7-22.8 arasında varyasyon göstermektedir. Türkiye'de vankomisin direnç oranları, *E. faecium* izolatlarında %22.8 ve *E. faecalis* izolatlarında %0.2 şeklinde bildirilmiştir (UMS, 2014; UAMDSS, 2015).

Enfeksiyon hastalıklarında antibiyotiklerin çoklu ve akılcı olmayan kullanımları sonucunda, ilaç dirençliliğinde çeşitlilikler artmaktadır. Enterokoklar ise toplumsal kökenli enfeksiyonların haricinde özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda artan oranda, vankomisin dirençliliği görülmektedir. Kolonizasyon ve tedavilerdeki zorlukları aşmak adına yoğun vankomisin uygulanması, enterokoklardaki direnç sıklığının görülmesine ve tedavide zorlukların yaşanmasına neden olmaktadır. Mikrobiyolojik işlemlerde moleküler çalışmaların varolması, otomatik sistemlere göre nokta atışı prosedürler gerçekleştirilerek dirençliliklerin hızlı, doğru ve hata payını azaltarak işlem görmesi önem kazanmaktadır. Antimikrobiyal ajanlara karşı zamanla ortaya çıkacak farklı dirençlilik durumları ve bunlara neden olan mekanizmanın ortaya konulması önemlidir.

Enterokoklarda gelişen vankomisin direnci ve vankomisine dirençli türlerin birçok antibiyotiğe de dirençli olması, enterokokal enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir. Vankomisin direnci ile ilişkili genlerin belirlenmesi, bu önemli direncin özelliklerini daha iyi anlamaya ve etkin tedavi ve mücadele yöntemlerine yardımcı olmaktadır. Bu çalışmada vankomisin direnci ve tür özellikleri farklı enterokok izolatlarında vankomisin direnciyle ilişkili önemli genlerden vanA, VanB ve VanC'nin PCR ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sınıflandırma Tarihi

Günümüzde enterokok biçiminde ifade edilen bakteri grubu daha öncesinde fekal kökenli streptokok olarak gruplandırılmıştır. Streptokoklar immünolojik olarak presipitasyon yöntemi (Rebecca Lancefield) ve aglütinasyon yöntemiyle (Griffith) incelenmiştir. Lancefield (1933), patojen streptokokları serolojik yöntemler kullanarak hücre duvar yapısındaki karbohidrat antijenlerine göre sınıflandırmış ve enterokoklara “D grubu streptokoklar” arasında yer vermiştir. Brown (1919), kanlı agar besiyerindeki üremelerdeki hemolizleri ( $\alpha$ ,  $\beta$  veya nonhemolitik) kullanarak streptokokları sınıflandırmıştır. Sherman (1937), streptokokları; üreme derecesi, hemoliz, antijen yapıları ve biyokimyasal özellikleri kullanılarak; piyojen streptokoklar, laktik streptokoklar, viridans streptokoklar ve enterokoklar biçiminde 4 gruba ayırmıştır. Jones (1978), sınıflandırmanın biraz daha gelişmesine neden olarak; oral, laktik, piyojen, anaerob ve diğer streptokoklar ile enterokoklar şeklinde bir gruplandırma gerçekleştirmiştir (Facklam, 2002; Akan, 2004; Berzeg, 2005).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (vol:2, 1986)'de *Streptococcaceae* familyası; anaerob ve fakültatif anaeroblar olarak (Tablo 1) incelenir (Bilgehan, 1995; Koneman ve ark, 2006).

**Tablo 1.** *Streptococcaceae* sınıflandırması

<b>Fakültatif Anaeroblar</b>	<b>Anaeroblar</b>
<i>Streptococcus</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
<i>Aerococcus</i>	<i>Ruminococcus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Coprococcus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Pediococcus</i>	
<i>Gemella</i>	

Bentley ve ark. (1991) , ardından Kawamura ve ark. (1995) katalaz negatif Gram pozitif kok olarak tanımladıkları izolatların hücre duvar yapılarına, DNA-RNA hibridizasyonlarına ve 16S-rRNA sıralamasının analizine göre *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Enterococcus* olarak sınıflandırmıştır (Koneman ve ark, 2006).

1984 yılına kadar *S. faecalis* ve *S. faecium* olarak adlandırılan enterokoklar, DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyonları yapılarak, *Streptococcus* cinsinden çıkarılıp *Enterococcus* cinsine aktarılması önerilmiştir. *Enterococcus* cinsi içindeki

bakterilere sonrasında diğer enterokok türleri de eklenmiştir (Koneman ve ark, 2006). Kabul görmüş türler (Tablo 2.) ve yeni katılmış türlerde mevcut durumdadır (Tablo 2.) (Moellering, 2000; Lebreton ve ark, 2014).

**Tablo 2.** Kabul görmüş ve yeni katılmış enterokok türleri (Lebreton ve ark, 2014).

Türler	İnsan	Memeli	Kuş	Bitki/Toprak	Su	Yiyecek
<i>E. aquimarinus</i> (2005)					+	
<i>E. asini</i> (1998)		+				
<i>E. avium</i> (1967)	+	+	+		+	
<i>E. caccae</i> (2006)	+					
<i>E. camelliae</i> (2007)						+
<i>E. canintestini</i> (2005)	+	+				
<i>E. canis</i> (2003)		+				
<i>E. casseliflavus</i> (1979)	+	+	+	+	+	
<i>E. cecorum</i> (1983)	+	+	+			
<i>E. columbae</i> (1993)			+			
<i>E. devriesei</i> (2005)		+				+
<i>E. dispar</i> (1991)	+	+	+			
<i>E. durans</i> (1937)	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> (1906)	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i> (1919)	+	+	+	+	+	+
<i>E. gallinarum</i> (1982)	+	+	+	+	+	+
<i>E. gilvus</i> (2002)	+					
<i>E. haemoperoxidus</i> (2001)					+	
<i>E. hermanniensis</i> (2004)		+				+
<i>E. hiraе</i> (1985)	+	+	+	+	+	+
<i>E. italicus</i> (2006)						+
<i>E. lactis</i> (2012)						+
<i>E. malodoratus</i> (1955)		+			+	+
<i>E. moraviensis</i> (2001)					+	
<i>E. mundtii</i> (1986)	+	+	+	+	+	
<i>E. pallens</i> (2002)	+					
<i>E. phoeniculicola</i> (2003)			+			
<i>E. plantarum</i> (2012)				+		
<i>E. pseudoavium</i> (1989)		+			+	
<i>E. quebecensis</i> (2012)					+	
<i>E. raffinosus</i> (1989)	+					
<i>E. ratti</i> (2001)		+				
<i>E. rivorum</i> (2012)					+	
<i>E. rotai</i> (2013)				+	+	
<i>E. saccharolyticus</i> (1985)		+		+		
<i>E. sanguinicola</i> (2008)	+					
<i>E. silesiacus</i> (2006)					+	
<i>E. sulfuresus</i> (1991)						+
<i>E. thailandicus</i> (2008)						+
<i>E. ureasiticus</i> (2012)					+	
<i>E. ureilyticus</i> (2013)				+	+	
<i>E. viikkiensis</i> (2011)			+	+		
<i>E. villorum</i> (2001)		+				

İnsan klinik örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* %80-90, *E. faecium* ise %5-10'luk bir orana sahiptir. Ortaya çıkmış olan bu oranlar çeşitli faktörlerin de etkisiyle değişim gösterebilir. Klinik örneklerden nadir olarak izole

edilen diğer türler; *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* ve *E. raffinosus*'dur. Bunları *E. avium*, *E. caccae*, *E. cecorum*, *E. dispar* ve *E. durans* takip etmektedir (UMS, 2014).

## 2.2. Mikrobiyolojik Özellikler

Enterokoklar, insan ile sıcakkanlı hayvanların GIS'inde bulunurken, dışkı ile kontamine olmuş sularda, topraklarda bulunmakta ve yiyeceklerle de bulaşabilmektedir. Enterokoklar indikatör mikroorganizmalar olarak içme sularında fekal kontaminasyonu göstermek amacıyla da kullanılır. İnsan dışkısında *E. faecalis* miktar olarak  $10^5$ - $10^7$  CFU/gr, *E. faecium* miktarından  $10^4$ - $10^5$  CFU/gr yaygın bulunur (Hijazi ve ark, 2009; Fisher ve Phillips, 2009). Enterokoklar oral kavitede, dental plaklarda, vajina ve deride az oranda bulunmaktadır. Bunun haricinde enterokoklar laktik asit üretmeleri sebebiyle de peynir imalatında başlatıcı olarak kullanılır (Facklam ve Teixeira, 1998; Billström, 2008).

### 2.2.1 Görünüm ve Boyanma Özellikleri

Enterokoklar 0,5-1 µm çapında, tekli halde, çiftli olarak veya kısa zincir biçiminde; yuvarlak veya oval şekilli, kok, kokobasil formunda bulunan bakterilerdir. Kullanılan besiyerlerine göre enterokoklar kok veya kokobasil biçiminde (katı besiyeri) ya da uzunca zincirler (sıvı besiyeri) oluşturdukları gözlemlenir. Gram boyamalarında Gram pozitif olarak tanımlanan enterokoklar, anilin boyalar ile de kolay şekilde boyanır. Enterokokların çoğunda hareket (*E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* türlerini hariç tutarsak) gözlenmemektedir (Facklam ve Teixeira, 1998).

### 2.2.2 Üreme Özellikleri ve Fizyolojik Karakterleri

Fakültatif anaerob olan enterokokların optimum üreme sıcaklığı 35°C (10-45°C arasında değişen sıcaklıklarda da üreyebilirler), en uygun üreme pH'ları ise  $7.2 \pm 0.2$  dir. Enterokoklar %5 koyun kanlı agar besiyerlerinde 18-24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 1-2 mm çaplı, streptokokların koloni yapılarından daha büyük koloni yapısında, kabarık görümlü ve gri ya da beyaz renkli, "S" koloni yapılarını meydana getirir (Resim 1). *E. faecalis* türünün 3'te 1'i β-hemoliz (insan, tavşan, at kanı ihtiva eden agar besiyerlerinde) oluşturabilir ancak %5 koyun kanı içeren agar besiyerinde β-hemoliz göstermez (Winn ve ark, 2006; Fisher ve Phillips, 2009). İstisna olarak kanlı (insan, tavşan, at ve koyun) agarlarda β-hemolizi *E. durans* türü

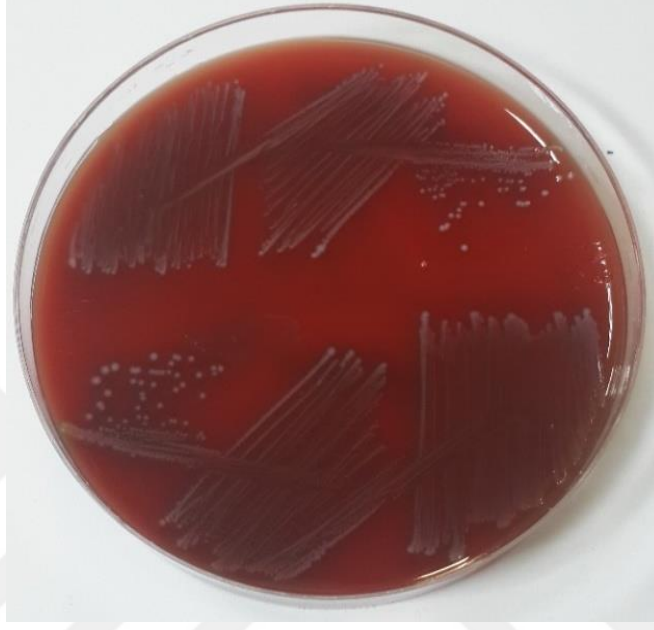
oluşturur. Diğer enterokok türlerinin neredeyse tamamına yakını  $\alpha$ -hemolitik ve nonhemolitik yapısını gösterir. Alfa-hemolitik görünen suşlar aslında “peroksit” üretmiş olan nonhemolitik suşlardandır. Besiyerinde görülen yeşil renkli hemoliz olma durumu  $\alpha$ -toksin üretimiyle değil, peroksitin eritrositlere etkisi sonucunda meydana gelmektedir. Koyun kanlı agar (%5) besiyerlerinde klasik gri-beyaz koloniler dışında sarı pigmentli koloniler yapan türler de (*E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. mundtii* ve *E. sulfureus*) mevcuttur. Yüksek sıcaklığın haricinde, tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu ortamlarda (% 6,5 NaCl) ve ayrıca safra tuzlarının (%40) varlığında dahi üremelerini gerçekleştirirler. Bile-Esculine (BE) agar besiyerinde eskülini hidrolize edebilir ve kolayca bu besiyerinde ürerler. Pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide (PYR) pozitifliğini *E. cecorum*, *E. columbae* ve *E. saccharolyticus* dışında çoğu enterokok, pyrrolidonyl arylamidase (PYRase) üreterek sağlamaktadır. Enterokok suşlarının tamamı, leucine aminopeptidase (LAPase) aktivitesi göstererek leucine  $\beta$ -naphthylamide’i hidrolize eder (Winn ve ark, 2006).

Enterokokların tanımlaması geleneksel yöntemler ile de yapılmaktadır. Bunun haricinde biyokimyasal olarak yapılacak testlerde Brain Heart Infusion Broth (BHI) sıvı besiyeri kullanılır. Ayrıca Moeller’in dekarboksilaz besiyerini de kullanarak arginin deaminasyonu görülebilmektedir. Yarı katı besiyerleri kullanılarak da enterokoklarda hareket bakılabilmektedir (Facklam ve ark, 1999).

Ford ve ark. (1994), gaita florasından *E. faecium*’un elde edilebilmesi adına Sefaleksim-Aztreonam-Arabinoz (CAA agar) adlı agarı geliştirmiştir. Gram pozitif bakteriler haricince Gram negatif üremesi de olan karışık klinik örneklerden izolasyonu gerçekleştirebilmek için, içeriğinde azid bulunduran Safra-eskülin-azid ve Enterococcosel agarlar kullanılmaktadır. Koloni renkleri selektif besiyerlerinin içeriğinde bulunan kimyasal maddelere göre değişiklik gösterebilir. Eskülin ihtiva eden Safra-Eskülin-Azid besiyerinde üremeler siyah halo biçiminde koloniler şeklinde ya da gri-beyaz koloni biçiminde olabilir. Tetrazolium tuzlarını içeren Columbia Kolistin-Nalidiksik Azid Agar (CNA) ve Fenil Etil Alkol Agar (PEA) kullanarak kolonilerin orta kısmında tuğla kırmızısı rengi oluşur. VRE’lerin varlığını gösterebilmek için 6  $\mu$ g/ml vankomisin içeren sıvı veya katı Enterococcosel agar ile BHI agar da kullanılabilir (Facklam ve Teixeira, 1998; Murray, 2000).

Laboratuvarların çoğunda identifikasyonun hızlı bir biçimde çalışılması için yarı otomatize kitler (API Rapid System, RAPID STR, RAPID ID32 System, Micro Scan Gram Positive Breakpoint Combo Panel) veya otomatize sistemler (Vitek-2 Gram

Pozitif İdentifikasyon Kartları, BD Phoenix Automated Microbiology System Gram Pozitif İdentifikasyon Panelleri) kullanılmaktadır. Enterokok türlerine ait DNA ve RNA yapılarına göre genetik ve moleküler yöntemlerle identifikasyonunda DNA hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ve ribotipleme gibi yöntemler kullanılır (Koneman ve ark, 2006).



**Resim 1.** Koyun Kanlı Agar (%5) besiyerinde enterokok üremesi ve bakteri kolonileri.

Enterokokların karbon metabolizmasında; solunum, iyon transportu, stres cevapları, reaktif oksijen türleri, pirimidin ve folat yolları önem arz etmektedir. Enterokokların temelde gerçekleştirdikleri metabolik faaliyetleri için karbon kaynağı, nükleik asitler ile B1, B6 ve B12 vitaminlerine de ihtiyaçları bulunmaktadır. *E. faecalis*'in üremesi ortamda bulunacak olan histidin, izolösin, metionin ve triptofan aminoasitleri ile gerçekleşmektedir. Geriye kalan türler ise arginin, glutamat, glisin, lösin ve valin aminoasitlerinin bulunması ile üreyebilmektedir (Murray ve ark, 1993). Tedavi sırasında yoğun kullanılan antimikrobiyal ajanların yapacağı baskı, enterokokların metabolik gereksinimleri suştan suşa farklılık gösterebilir (Facklam ve Teixeira, 1998).

### 2.2.3 Hücre Duvarı Yapısı ve Antijenik Özellikleri

Enterokokların hücre duvarı sırasıyla; peptidoglikan, teikoik asit ve polisakkarit bileşenleri ile oluşmaktadır. Hücre duvar yapısının %40'ını peptidoglikan oluştururken, diğer kısımlar ramnoz ihtiva eden polisakkarit ve ribitol bulunduran teikoik asit bileşenleridir. Peptidoglikanlar, glikan zincirler ile bu zincirlerle bağ yapmış olan kısa peptitler L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala yapısından oluşur. Pentapeptid yan zincirler vasıtasıyla komşu peptidlere çapraz bağlantı yaparlar. Peptidoglikan bileşenlerinin dışında yardımcı olarak görev alan polimer yapılarının görevleri tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Lancefield'e göre serolojik tiplendirme; çoğu streptokokun, hücre duvarına hakim olan karbohidratlara göre sınıflandırmasına rağmen, serolojik tiplendirmeleri lipoteikoik asitlerin (LTA) sahip oldukları antijenik niteliklerine göre yapılan enterokoklar "D grubun"da yer almaktadır. Grubun özelliği olan D antijeni, gliserole bağlanmış glikozu yoğun olarak içeren poligliserolfosfatın teikoik asit polimer yapısıdır. Streptokokal D antijenleri, enterokok türleriyle *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Vagococcus* ve *Streptococcus bovis* kompleksinde bulunmaktadır (Facklam ve Teixeira, 1998; Fisher ve Phillips, 2009).

### 2.3. Epidemiyoloji

İnsan sindirim sisteminin parçası olan barsaklara ait floranın üyesi durumunda bulunan enterokoklar, toplum kökenli ve hastane kökenli enfeksiyonları meydana getirebilir. Çoğunlukla enterokoklarla oluşan enfeksiyonların büyük bir kısmı enterokokların hastaya ait kendi floralarından ortaya çıktığı düşünülür. Enterokoklar çevre şartlarına gösterdikleri dayanıklılıklarından dolayı çoğunluğu her ortamda yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilir. Hastanede yatan, periton veya hemodiyaliz yapılmış tedavi altındaki hastalarda enfeksiyon gelişebilir. Bu şekil gerçekleşen enfeksiyonlarda etkenin çoğunlukla eksojen yani dış kaynaklı olduğu düşünülür. Hastalığı barındıran bir hastadan diğer hastalara enfeksiyonu bulaştırma konusunda kesin bir bulaş yolu yoktur. Hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olan enterokoklar, çoğunlukla hastane çalışanlarının ellerinden ve sık olarak da hastane ortamından izole edilmiştir. Enterokoklar hastane ortamında kullanılan stetoskop, kapı tokmağı, yatak, elektronik termometre benzeri cansız yüzeylerde uzun süreler varlıklarını sürdürebilir (Livornese ve ark, 1992; Moellering, 2000).

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC)'nin 1984 yılında yayımlanan verilerinde, enterokokların hastane



enfeksiyonlarındaki oranının %10.4 ile en sık görülen etkenlerden biri olduğu belirtilmiştir (Chenoweth ve Schaberg, 1990). 1980'li yıllarda enterokoklarda ortaya çıkan beta-laktam ve aminoglikozid antibiyotiklerine direnç nedeniyle, vankomisin uzun yıllar tek uygun antibiyotik olarak uygulanmıştır. Avrupada VRE ile ilgili ilk bildirimler İngiltere'den Uttley ve ark. (1988) ve Fransa'dan Leclercq ve ark. (1988) tarafından yapılmıştır. Avrupanın diğer ülkelerinden (Sahm ve ark, 1989) ve ABD'den de bu şekilde bildirimler olmuştur. National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS)'in raporunda, 1989 ve 1993 yılları arasında hastane kökenli VRE enfeksiyon oranları %0,3'lük bir orandan %7,9 gibi bir orana ulaşmışken hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde 34 kat (%0,4'ten %13,6'ya) bir artış gözlemlenmiştir. İngiltere'deki yoğun bakım ünitelerinde 1971-1985 yılları arasında kan kültür izolatlarında VRE görülme sıklığı %3 iken, 1986-1995 yılları arasında bu oran %12'ye yükselmiştir (Bonten ve ark, 2001). 2000 yılına gelindiğinde yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda ve normal servislerdeki hastalarda hastane kökenli VRE'lerin enfeksiyon oranları %25 gibi bir oranın üzerine yer almıştır (Başustaoğlu, 2004). 2013 yılında yayımlanan CDC verilerine göre ABD de her yıl 66.000 enterokok enfeksiyonu meydana gelmektedir. 20.000 ilaç dirençli enterokok görülürken, ilaç dirençliliği sonucunda 1.300 ölüm meydana gelmiştir. Tahmini VRE oranı %40 olarak verilmiştir (CDC, 2013).

Enterokoklar ile VRE'nin etken olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonlarda risk faktörleri şu şekildedir: (Tok, 2006).

1. Demografik (nüfusla ilgili) risk faktörleri:
  - Hastane yataklı servislerinde veya yoğun bakım ünitelerindeki (YBÜ) tedavi olan yatan hastaların kalış süreleri,
  - VRE kolonizasyonu belirlenen ya da enfekte hastalara hizmet veren hemşirenin ya da personelin başka bir hastaya bakım yapması.
  - Hastaların hastane içinde servisler arası transferlerin gerçekleşmesi,
  - Tıbbi malzemelerin VRE ile kontaminasyonu
2. Hastalıkların geri planındaki ağırlığı ile ilgili risk faktörleri:
  - Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II) skorunun yüksek olması,
  - Böbrek yetmezliğinin olması,
  - Yakın zamanda ameliyat geçirmiş olması,
  - *Clostridium difficile* etkenine bağlı kolit oluşması,

- Karaciğer ve safra yolları hastalıklarının görülmesi,
  - Bağışıklık sistemi baskılanmış veya organ alıcısı olma durumu,
  - Enteral tüple beslenme nedenleri,
3. Antimikrobiyaller ilgili risk faktörleri:
- Antibiyotik ile tedavinin zaman aralığı ve ölçüsü
  - Kullanılmış olan antibiyotikler
  - Cerrahi müdahale öncesi barsak hazırlıkları

Enterokoklar, özellikle *E. faecium*'ların tedavisinde kullanılan antimikrobiyallerin çoğuna direnç göstermektedir. Bu sebeple VRE enfeksiyonlarının sağaltımı zor olmaktadır. Kolay yayılım göstererek, hastane ortamında uzun süre kalan VRE'lerin az bir kısmı enfeksiyon oluştursa da çok sayıda kişide kolonizasyon oluşturabilirler (Tenover ve McDonald, 2005; Mazuski, 2008).

#### 2.4. Enterokok Türlerinin Özellikleri

***E. faecalis*:** Gastrointestinal sistemin normal flora elamanıdır. Ağız, karaciğer ve safra yolları ile vajinadan da izole edilmiştir. İnsanlarda enfeksiyon kaynağı olarak en sorunlu olan türdür. İnsanlar dışında diğer hayvan türlerinde de bulunabilir. Üriner sistemde yarattıkları enfeksiyonlar dışında; yara yerlerinde, derin pelvik apselerde, periton sıvısı, endokardit ve kan kültürlerinde tespit edilmiştir. Kanlı agar besiyerlerinde beta-hemolitik olup (%5 koyun kanlı agar hariç), %6,5'luk NaCl bulunan sıvı besiyerinde ve pH 9,6'da dahi ürer. Arginin aminoasidini hidrolize eder, mannitol ihtiva eden sıvı besiyerinde asit meydana getirir, sorboz bulunan besiyerlerinde asit oluşumu gözlenmez. İçeriğinde sorbitol barındıran sıvı besiyerlerinde farklı reaksiyon gösterir (Barie ve ark, 1990; Koneman ve ark 2006; Akçimen, 2010).

***E. faecium*:** İnsan dışında sığırların GİS'inde de görülmektedir. Yiyeceklerde ve yemlerde de tespit edilmiştir. Genetik benzerliği açısından iki adet biyotipi bulunmaktadır. *E. faecalis*'e oranla, kullanılan antimikrobiyal ajanlara olan direnç yapısı daha çoktur. Alfa-hemolitik olup %6,5'luk NaCl'li ortam ile 9,6'lık pH'da ürer. Arginin aminoasidini hidrolize eder, mannitol içeren sıvı besiyerinde asit meydana getirirken, sorboz bulunan sıvı besiyerlerinde asit oluşmaz ve sorbitol

içeren sıvı besiyerinde çeşitli oranlarda reaksiyon gösterir (Barie ve ark, 1990, Koneman ve ark 2006; Akçimen, 2010).

***E. gallinarum***: Evcil kuşların gastrointestinal sisteminde görülür. Vankomisine düşük düzey intrinsik direnç gösterir. Koyun kanlı agarda (%5), nonhemolitik olarak üreme gerçekleştirir. At kanı ihtiva eden agarda beta-hemoliz gözlenir. Hareketlidir. %6,5'luk NaCl ortamı ile pH 9,6 da üreme gösterir. Besiyerlerinde pigmentleşme gözlenmez. Arginin aminoasidini hidrolize eder, mannitol içeren bulunduran sıvı besiyerlerinde asit oluşumu gözlenir. Sorboz bulunduran sıvı besiyerlerinde asit oluşturmaz ve sorbitol içeren sıvı besiyerinde farklı reaksiyonlar gösterir (Barie ve ark, 1990, Koneman ve ark, 2006; Akçimen, 2010).

***E. avium***: Kanatlı veya kümes hayvanları ile köpek gibi hayvanlarda bulunabilir. İnsan GİS florasının elemanıdır. Otit, apendisit ve beyin apselerinden izole edilenleri vardır. Koyun kanlı agarda (%5) alfa-hemolitik, %6,5'luk NaCl'li ortamda üremeleri zayıf olarak gerçekleşir. H<sub>2</sub>S gözlenir ancak renkli koloniler yapmazlar. Sıvı besiyerlerinde mannitol, sorbitol ve sorboz bulundurması ile asit oluşumu gözlenir. Fakat arginin amino asidini hidrolize etmez (Barie ve ark, 1990; Koneman ve ark 2006; Akçimen, 2010).

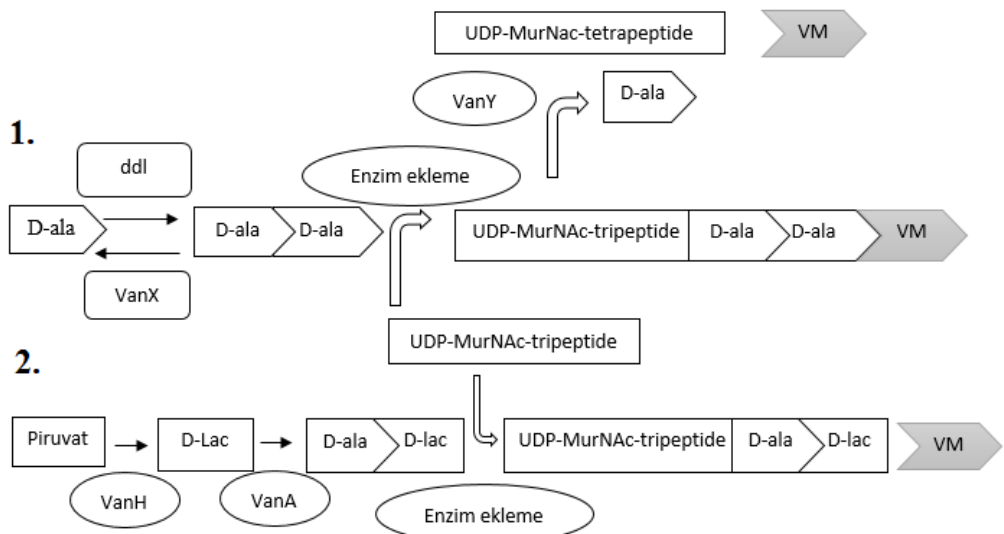
***E. casseliflavus***: İnsan ve hayvanların haricinde bitki ve toprakta gözlenmektedir. Vankomisine düşük düzeyde dirençlidir. İnsan enfeksiyonlarını fırsatçı olarak yapar, %6,5'luk NaCl ortamında ve pH 9,6 da ürer. Hareketli olmalarıyla diğer enterokoklardan ayrılır (*E. gallinarum* hariç) ve kanlı agar besiyerinde sarı pigment yapar. Arginin aminoasidini hidrolize eder, mannitol ihtiva eden sıvı besiyerinde asit oluşumu gözlenir. Sorboz'un bulunduğu ortamda asit oluşturmaz ve sorbitol içeren sıvı besiyerinde farklı oranlarda reaksiyon gösterir (Barie ve ark, 1990; Koneman ve ark, 2006; Akçimen, 2010).

***E. durans***: Kuru gıdalardan ve süttten de tespit edilmiştir. Nadiren de olsa insan ve hayvanların barsak ve üriner sistemlerinden bildirilmiştir. %5 koyun kanlı agar besiyerinde beta-hemolitik olup, %6,5'luk NaCl'li ortamda ve 9,6 pH'da ürer. D antijen yapısını içermez, arginini hidrolize edebilir ancak mannitol, sorboz ve

sorbitol ihtiva eden sıvı besiyerlerinin hiçbirinde asit oluşumu gözlenmez (Barie ve ark, 1990; Koneman ve ark, 2006; Akçimen, 2010).

## 2.5. Direnç Mekanizması

Enterokoklarda gözlenen glikopeptid direnci, farklı direnç fenotipleri ile eksprese olur ve *vanA*'dan *vanM*'ye [D-ala-d-lak (*vanA*, *vanB*, *vanD* ve *vanM*), D-ala-D-ser (*vanC*, *vanE*, *vanG* ve *vanL*)] kadar çeşitlilik gösterebilir. (Lebreton ve ark, 2011). Direnç mekanizması tüm fenotiplerde benzerlik gösterir, vankomisin D-ala-D-ala hedefine düşük düzeyde ilgi ile bağlanmasıyla ortaya çıkmaktadır. Ortamda bir indükleyici olarak vankomisin varlığı bu antibiyotiğe olan dirençten sorumlu gen bölgesinin transkripsiyonun uyarılması için sensör kinaz enziminin düzenleyici bir yanıt proteini ile ilişkiye girmesi gerekmektedir (Şekil 1). Transkripsiyon sonucu okunan genler, vankomisin düşük affiniteyle bağlandığı hücre duvarı öncüllerinin (D-ala-D-lak veya D-ala-D-ser ile sonlanan) oluşumunu sağlayan ligaz enzimlerine (*ddl*) dönüştürür. Hücre duvarının yapısında yer alan glikopeptidlere duyarlı hedefleri, D-ala-D-ala dipeptidlerini kesen mevcut diğer gen ürünleri ortadan kaldırır. Peptidoglikan öncüllerindeki bu değişiklikler VRE'lerde glikopeptidlerin hedefleri için azaltılmış bağlanma affinitesine (1000 kat düşük ilgi D-ala-D-ala ve 7 kat düşük ilgi ise D-ala-D-lak veya D-ala-D-ser) yol açar ve bu temel mekanizma ile hücre duvarı sentezinin inhibisyonu engellenir. (Murray, 2000; Guardabassi ve Dalsgaard, 2004; Lebreton ve ark, 2011).



Şekil 1. Vankomisin hücre duvarına etki mekanizması (Arthur, 1994).

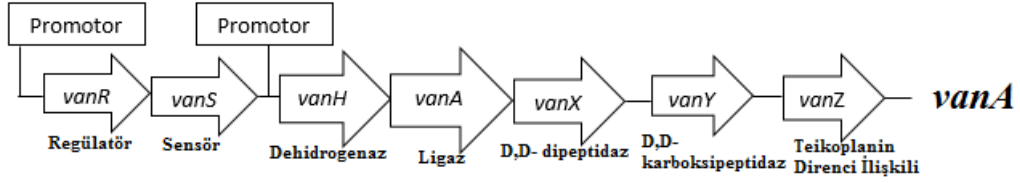
1. Glikopeptidlere duyarlı, 2. Glikopeptidlere dirençli

VRE olgularındaki artış, araştırmacıların direnç genlerinde kodlanan protein yapılarını ve işlevlerini kapsamlı bir şekilde çalışmaya yönlendirmiştir. Enterokokların yüksek düzey glikopeptid direncine sahip olmaları fenotipik özellikleri kodlayan genetik bilgilere ulaşmayı kolay hale getirmiştir. Mevcut bilgiler kapsamında, vankomisine direnci bulunan enterokoklar, vankomisin ve teikoplanine olan direncin uyarılabilir veya yapısal olmasıyla diğerk bakterilere transfer edilip edilememesine göre bilinen en iyi glikopeptid direnç tipleri; *vanA*, *vanB*, *vanC* ve *vanD* dirençleridir (Arthur ve Courvalin, 1993; Simjee ve Gill, 1997; Fines ve ark, 1999).

### 2.5.1. *vanA* Tipi Direnç

Enterokoklarda en iyi tanımlanmış direnç mekanizması *vanA* tipi direncidir. Yüksek düzeyde vankomisine ve teikoplanine direncinden sorumlu olan *vanA* direnci, 39-40 kDa ağırlığında sitoplazmik membran proteinleridir. Direncin oluşmasından sorumlu olan proteinler sadece vankomisin ortamda olduğu zaman sentezlenebilir. Hücre duvarının sentezi için bir ligaz (*vanA* geni ile kodlanır), bir D-D-dipeptidaz (*vanX* geniyle kodlanır) ve bir D-D-karboksiptidaz'ın (*vanY* geni ile kodlanan bu enzim *vanX* geniyle kodlanan protein ile benzer aktivitededir ama direnç için mutlak gerekli değildir) mutlak varolması gerekir. VanA fenotipiyle vankomisine (MİK 64-1000µg/ml) ve teikoplanine (MİK 16-512µg/ml) olan yüksek düzeyde indüklenebilir direncin oluşturulmasıyla tanımlanır. Hedef noktası modifiye olmuş D-ala-D-lak'dır. Bunun gibi bir direncin ortaya çıkması başta *E. faecium*, *E faecalis* ve kısmen *E. avium*'da görülebilmektedir. *vanA* kümesi (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* ve *vanZ*) plazmid DNA'sına entegre olabilen transpozon denen temel genetik yapıdan ve plazmidlerden ayrı olan bu küçük DNA parçaları üzerinde yer almıştır (Şekil 2). Tn1546 olarak tanımlanan transpozonun 4 işlevsel grubun toplam dokuz polipeptidini kodladığı 10.5 kb'lık ağırlığı olan genetik bir elemandır (Arthur ve Courvalin, 1993; Ligozzi ve ark, 1998). Tn3 transpozon ailesine olan benzerliği baş ve son bölümlerinde 36-38 bp'lik inverted dizilerini barındırmaktadır. Inverted dizileri ile direnç genleri, buldukları plazmidten çıkarak başka bir enterokokta bulunan plazmid yapısına kolay bir şekilde yerleşebilir. Kazanılmış olan direnç genleri, geniş konakçı profili olan plazmid yapıları ve transpozonlar vasıtasıyla başka türlere kolayca transfer olabilir. Bu durumun *Staphylococcus aureus* izolatlarının

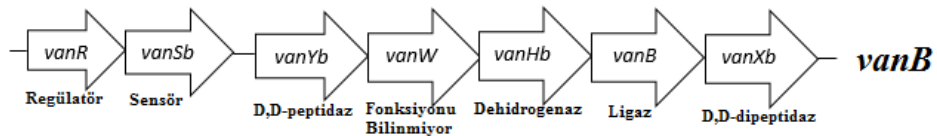
vankomisine dirençlilik gösteren *vanA* geni içermelerinin gösterilmesi en fazla dikkat çekici olaydır (Bozdoğan ve Leclercq, 1999; Tremlett ve ark, 1999; CDC, 2002; Weigel ve ark, 2003).



Şekil 2. Transpozon Tn1546'nın *vanA* kümesi (Werner, 2008).

### 2.5.2. *vanB* Tipi Direnç

Bu direnç tipi Tn1547 transpozonunda kodlu olarak bulunan genin sentezlediği 39.5 kDa moleküler ağırlığa sahip membran proteiniyle oluşturulur (Şekil 3.). Orta düzey vankomisin direnci bulunan enterokoklar, vankomisine dirençli (MİK: 4-1000 µg/ml) ancak teikoplanine duyarlı durumdadır (MİK: 0.5-1 µg/ml). VanB tipi direnç indüklenebilen ve kazanılmış bir direnç oluşturmaktadır. D-ala-D-lak *vanB*'nin modifiye edilmiş hedefidir (Arthur ve Courvalin, 1993). Genelde *vanB* direnç geninin kromozom üzerinde yerleşimi gösterilmiştir. Konjugasyon ile aktarılabilirdiği ve bazı VRE pozitif hastalardan izole edilen VRE'lerde plazmidler üzerinde de yer alabileceği saptanmıştır (Handwerger ve ark, 1992; Lavery ve ark, 1997; Hanrahan ve ark, 2000).

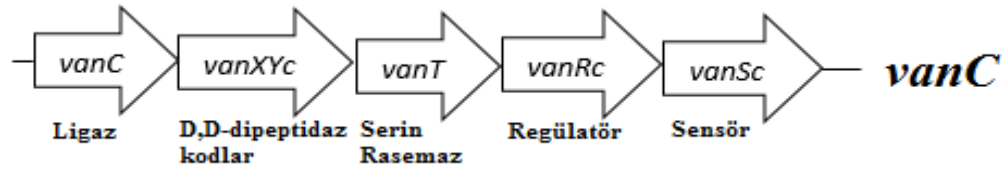


Şekil 3. *vanB* gen kümesi (Werner, 2008).

### 2.5.3. *vanC* Tipi Direnç

*E. gallinarum* (*vanC-1*), *E. casseliflavus* (*vanC-2*) ve *E. flavescens* (*vanC-3*) suşlarında var olan direnç genleri, vankomisine düşük seviyede görülen direnç olarak tanımlanır. VanC tipi direnç; vankomisin direncini kodlayan genler diğer *van* genlerinden (A, B, D ve E tipi direnç genleri) farklı olarak endojenik yerleşimlidir. Ancak Sun ve ark (2014), doğal olarak vankomisin dirençli bir suş içindeki bir genin (*vanC-1*) kromozomal yerinin diğer türlere geçişini engellemediğini, aktarılabilirdiğini

böylece de tür çeşitliliğine katkıda bulunduğunu vurgulamıştır. *E. gallinarum* (*VanC-1*), *E. casseliflavus* (*VanC-2*) ve *E. flavescens* (*VanC-3*) türlerine ait spesifik ligazlar içermektedir. *VanC* membran proteinince oluşturulan moleküler ağırlığı 38 kDa'luk, indüklenemeyen direnç tipidir ve hedef D-ala-D-ser yapısıdır (Şekil 4.). *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* suşları vankomisine düşük düzeyde (MİK: 2-32 µg/ml) dirençli ve teikoplanine (MİK: 0.5-1 µg/ml) duyarlılık gösterirler. Yapısal yerleşimli dirençleri sebebiyle intrinsik direnç olarak adlandırılırlar ve diğer direnç tiplerindeki gibi aktarım olmamaktadır (Vincent ve ark, 1991).



Şekil 4. *vanC* gen kümesi (Werner, 2008).

## 2.6. Enterokoklarda Glikopeptid Direncinin Saptanması İçin Kullanılan Yöntemler

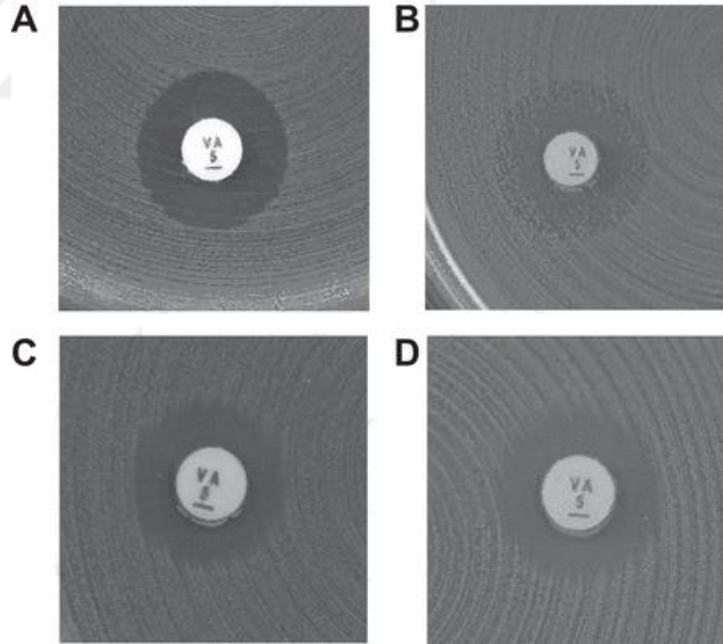
Vankomisin direncinin belirlenebilmesi için; MİK düzeylerinin belirlenmesi, agar disk difüzyon yöntemi ve agar sınır değer testleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde baskılanabilen dirençli izolatların da tanımlanabilmesi için inkübasyon süresinin 18-24 saat olması gerekmektedir (EUCAST, 2013).

*VanA* geni tarafından kodlanan direnç; MİK belirlenmesi, disk difüzyon ve agar sınır değeri yöntemiyle kolaylıkla saptanır. Ancak *vanB* geniyle kodlanan direncin saptanması *vanA*'nın saptanmasına oranla zordur. Rutin laboratuvarlarda nadiren kullanılan agar veya buyyon dilüsyon yöntemi yerine MİK belirlenmesiyle kesin sonuçlar elde edilebilir. Eski yayın ve raporlarda *vanB* genine ait direncin otomatize yöntemlerle belirlenmesinin problemlili olduğu düşünülmüştür (Swenson ve ark. 1995; Endtz ve ark, 1998). Güncellemeleri yapılmış olsa da otomatize yöntemlerle ~~hala daha~~ *vanB* direncinin saptanmasının iyileştiğine dair çalışmalar yetersiz durumdadır (Garcia-Garrote ve ark, 2000; Papadimitriou-Olivgeris ve ark, 2016). European Centre for Disease Prevention and Control (EUCAST) tarafından belirtilen disk difüzyon yöntemi (5µg vankomisin diski) kurallara titizlikle uyulduğunda tatmin edici performans elde edilebilmektedir (EUCAST, 2013). MİK veya disk difüzyon sonuçları yorumlanırken dikkatli olunmalıdır. Yorumlanan izolatların *E.*

*gallinarum* veya *E. casseliflavus* olması önemlidir. Çünkü arabinoz şekerlerine pozitif olmaları *E. faecium* şeklinde identifiye edilmesine neden olabilir. *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*'u özellikle *E. faecium*'dan ayırabilme doğrultusunda methyl-alpha-D-glucopyranoside (MGP) adı verilen bir testle veya hareket testi yapılabilir. Çünkü *E. faecium* MGP negatiftir ve hareket testi negatiftir (Devriese ve ark, 1996). Tür düzeyinde tanımlama için diğer bir yöntem olan MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Time-of Flight Mass Spectrometer) kütle spektrometre yöntemi de kullanılabilir (Griffin ve ark. 2012).

### 2.6.1. MİK Değerlerinin Belirlenmesi

MİK değerlerinin belirlenebilmesi için agar dilüsyon, buyyon dilüsyon veya gradyan MİK yöntemleri uygulanabilir. Buyyon mikrodilüsyon yöntemi ISO 20776-1 standartlarına göre uygulanır. Vankomisin direncini tarama amacıyla MİK gradyan şeritleri McFarland standardı iki olan yüksek inokulumda BIH agar kullanılmaktadır, fakat bu yöntem ile MİK değeri saptanamamaktadır (EUCAST, 2013).



**Resim 2.** EUCAST Enterokokların vankomisin için okuma örnekleri ile zon çaplarına göre duyarlılık raporlamaları

- Duyarlı olarak raporlanabilmesi için keskin zon kenarları ve zon çapı  $\geq 12$ mm.
- Dirençli olacak şekilde raporlananlar zon kenarlarının belirsizliği ve/veya zon içi kolonileri bulduran görsel (EUCAST, 2013).



### 2.6.2. Disk Difüzyon Testi

Disk difüzyonda zon kenarlarının ölçümü ve zon içinde üremesi olan mikrokoloniler arkadan gelen ışık yardımıyla gözlemlenir. İzolatların vankomisin duyarlı biçimde raporlanabilmesi için keskin kenarlı zonu olmalı ve zon çapı sınır değer üzerinde olmalıdır. Zon kenarlarındaki belirsizlikler veya zon içinde üremiş olan mikrokoloniler araştırılması yapılan izolatlar için dirençli düşünülebilir. İzolatlar zon çapları Resim 2’de görüldüğü gibi şüpheli olarak kendini gösteriyorsa en kesin yöntem olarak MİK yöntemi kullanılarak doğrulanma işlemleri yapılmadan duyarlı olarak raporlanmamalıdır (EUCAST, 2013).

### 2.6.3. Agar Sınır Değer Testleri

Vankomisine direnci gösteren *vanA* ve *vanB* pozitifliğini belirlemede güvenilir yöntem olan agar sınır değeri testidir. BHI agar içine 6 µg/mL vankomisin ilave edilir ve  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  CFU, 0.5 McFarland homojen süspansiyondan 10 µl aktarılması ile uygulanır. 24 saat  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ’de normal atmosferde inkübasyon edilmesi gereklidir. Üremenin bir koloniden fazla olması pozitif olarak bildirilir (EUCAST, 2013).

### 2.6.4. Genotipik Testler

Vankomisine direnç *vanA*, *vanB* ve *vanC* genlerini hedefleyen PCR temelli yöntemlerle de saptanabilmektedir (Fang ve ark, 2012; Gazin ve ark, 2012). PCR kullanımı çoğu mikroorganizmada tür, cins ve genotip belirlenmesinde kendine yer bulduğu gibi enterokoklarda da kendisine kullanım alanı edinmiştir. Enterokoklarda cins düzeyinde tanımlama yapmak amacıyla, elongasyon faktör *tuf* (EF-Tu) geni ve tür düzeyinde tanımlama yapmak için D-alanin/D-laktat ligaz geni ile *groESL* genleri hedef alınmıştır (Domig ve ark, 2003). PCR temelli yapılan çalışmalar ve metodlar antibiyotik direncinin saptanması için kullanılmış aynı zamanda da duyarlılık testi hızla yapılırken, vertikal yayılımı bulunan direnç genleri veya gen mutasyonlarının sebebi nedeniyle izole edilen suşlar arasında klonal bağlantı da gösterilebilmiştir. *Van* genleri için Miele ve ark. (1995), primer seti geliştirmiş, Klare ve ark. (1995) aynı yıl içerisinde *vanA* genine yönelik PCR yöntemini kullanmıştır. Del Vecchio ve ark. (1995), floresan kullanımına dayalı PCR sistemi olan LightCycler’ı kullanmıştır. Enterokokların tanısı ve epidemiyolojik sürveyansında tür düzeyinde olan tayini için 16S rRNAlarını hedeflemiş primerler ile glikopeptidlere ait dirençliliğin tespitinde eş zamanlı olarak *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *C2* ve *C3* genlerini de hedef alan diğer

primerlerin de kullanıldığı multipleks PCR geliştirilmiştir (Dutka-Malen ve ark, 1995; Perez-Hernandez ve ark, 2002).

Spesifik ve Random Amplifikasyon PCR (SARA-PCR) yönteminde tek reaksiyon ile enterokoklar tür düzeyinde tanımlanmakta ve *vanA* direnç geni gösterilmektedir. Uygulanmasında *vanA* primer setine dayalı teknikle işlemler gerçekleştirilir. Suşların içermiş oldukları 700bp'lik *vanA* direnç geni bulunan bant ile örnekler oluşur. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) yöntemi ile *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* ve *E. durans* suşlarının ayrımı için uygulanmaktadır. tRNA-intergenik length polimorfizm analizi (tDNA-PCR) sadece insan kaynaklı enterokokların değil aynı zamanda hayvan orijinli enterokok türlerin ayrımında da denenmiştir. Nükleik asit hibridizasyon yöntemi 16S rRNA ve 23S rRNA gen yapıları ile *vanA*, *vanB*, *vanC* ve *vanD* genlerinin hedef alınarak prob kullanılan yöntemdir. Hedef olarak *vanA* ve *vanB* genlerinin primerlerinin kullanıldığı, özgün mRNA varlığını gösteren Reverse Transcription PCR (RT-PCR) yöntemi de kullanım alanları arasındadır (Domig ve ark, 2003).

## 2.7. Vankomisine Dirençli Enterokok Saptama Yöntemleri

VRE oranlarındaki artış yüzünden izolasyonun hızlı bir şekilde yapılabilmesi amacıyla içeriğinde vankomisin bulunduran besiyerlerine gereksinim ortaya çıkmıştır. VRE kolonizasyonunu belirlemede ve selektif izolasyonunda standart besiyerlerinin yerine içeriğinde 6 µg/ml vankomisin bulunduran enterokokkosel vankomisin broth veya BHI-vankomisin agar uygulanabilmektedir (Facklam ve Sahm, 1995).

Disk difüzyon testi (8-32 µg/mL) ile düşük düzey dirençlilikten sorumlu olan *vanB* veya *vanC* direnç genilerinden özellikle *vanC* genini belirleyemez. Bu duruma uygun olarak vankomisin “agar tarama” adı verilen yöntem kullanılabilir. Enfeksiyon kontrolü, tedavisi ve sürveyans çalışmalarında *vanC* genini bulunduran suşların diğer *vanA* veya *vanB*'ye sahip suşlardan ayrımı yapılmalıdır. Dirençliliğin saptanmasında *E. gallinarum*'un *vanC* tipi direnç varlığı sorun teşkil etmektedir. İntrinsek olarak *vanC* genini barındırır ve vankomisine ait MİK değerleri 2-32 µg/ml'dir. *VanC*'nin varlığı yapılan tedavilerde başarısızlıkla ilişkisi tartışmalıdır (Kohner ve ark, 1997; Başustaoğlu, 2004).

Agar tarama testinde üreme olması *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerindeki *vanA* ya da *vanB* tipi direnci gösterir ancak bu durumda tür düzeyinde tanımlama

yapılmasına gerek durulmaktadır. Gen birlikteği olarak *vanA* ve *vanC* tipi direnç *E. gallinarum*'da gözlemlenmiştir. Varolan direncin ayrımını yapabilmek için MİK seviyelerinin saptanması yardımcı olmaktadır. MİK değerlerine bakıldığında >16 µg/mL düzeyinde *VanC* tipinde MİK değeri belirlenemez. MİK değeri >32 µg/mL *vanA* ve *vanB* tipi dirençlerde belirlenebilir. Ampisilin ve aminoglikozid direncine *vanC* bulunduran izolatlarda çok sık gözlenmektedir (Kohner ve ark, 1997; Koneman ve ark, 2006)

Clinical and Laboratory Standart Instute (CLSI) tarafından 1997 yılında MİK yapılması için disk difüzyon yöntemi uygulanan izolatlarda orta duyarlı sonuçların bulunması gerektiği belirtilmiştir. Bu izolatların tür seviyesinde tanımlanması gerekmektedir. Disk difüzyon ya da yapılacak olan MİK 24 saatlik inkübasyon tam olarak tamamlanmalı ve değerlendirilmelidir. İşlemleri hızlandırmak adına kullanılan otomatize sistemler halen *vanB* ve *vanC* tipi direncini tanımlamada yetersizdir. Sürveyans taramalarında hasta başı ve çevrelerden yapılacak olan ekim için D-Coccosel agar besiyerleri (6 µg/mL vankomisin ve 4 µg/mL seftazidim içeren) kullanılabilir. İnkübasyon süresi 24-72 saat ve 37°C sıcaklık altında inkübasyona tabi tutulmalıdır. Üreme gözlenen siyah koloniler tür düzeyinde tanımlama yapabilmek için kanlı agar besiyerlerine pasajları yapılır. Taramalar sırasında negatif olarak bulunan kültürler bir hafta ara ile en az üç kez tekrar ekimleri yapılmalıdır. Agar tarama yöntemi %96-99 gibi bir oranla duyarlılık gösterirken %100 oranında özgüllüğü olduğu belirtilmiştir (Garcia-Garrote ve ark, 2000; Koneman ve ark, 2006; Papadimitriou-Olivgeris ve ark, 2016).

### **2.7.1. Enterokoklarda Glikopeptid Direncinin Aktarım Yolları**

Enterokoklarda kazanılan direnç, mutasyonlar ya da yabancı DNA'nın aktarılması ile olur. Enterokoklarda direnç genlerinin aktarımı birçok yolla olmaktadır. Özellikle enterokoklar arasında en yaygın aktarımın konjugasyon ile gerçekleştiği bilinmektedir. Ek olarak enterokoklarda; kromozomlar veya plazmidler üzerinde bulunan transpozonlar ile yeni bir konak bakteriye direnç geninin entegre olarak aktarıldığı da gösterilmiştir (Simjee ve Gill, 1997; Çöleri, 2002).

Enterokokların sahip oldukları glikopeptid direnç genlerinin konjugatif yollarla transferinde başarılı olmasının ve konjugasyon transfer sıklığının yüksek olmasının birçok nedeni mevcuttur. Bazı *E. faecalis* plazmidlerinin konjugatif transferi bir seks-feromon sistemi sayesinde düzenlenir. Alıcı potansiyel hücreler, verici plazmid

taşıyan hücreler ile eşleşmeye tam uygun bir cevap için küçük peptid hormonlarını salgırlar. Hormon sentezi gerçekleştikten 30-40 dakika sonrasında, verici hücrelerde eşleşmenin indüklenerek başlatıldığı gözlenmiştir. Verici hücreler alıcı ile rastgele çarpışmak ve konjugasyon gerçekleştirebilme sıklığını arttırmak için yüzey adezyon proteinleri sentezleyerek eşleşme topluluklarını meydana getirir. Bu hormon salınımı sayesinde verici hücrelerdeki plazmid transfer sıklığının 1000 kat arttığı belirlenmiştir (Leclercq ve ark 1988). VRE'lerde yüksek seviye glikopeptid direnç fenotipi gösteren genler yüksek kopya sayısına ve aynı oranda stabiliteye sahip plazmidler ile bu plazmid yapılarına entegre olan transpozonlarda bulunurlar. Plazmid veya kromozomlarda yer alan konjugatif transpozonlar yoluyla kazanılmış glikopeptid direnci yine insersiyon dizileri içeren transpozonun başka bir konakçı DNA'ya entegre olabilmesi ile kolaylıkla aktarılabilir. Direnç geni barındıran plazmidin sabitliğini ve kopya sayısının yüksek oranlarda olması, direncin stabilitesi ve transfer edilebilme olasılığını sağlam temellere bağdaştırmış olur (Clewel, 1993; Dunny ve ark, 1995; Simjee ve Gill, 1997).

### **2.7.2. Glikopeptid Direncinin Enterokoklardan Diğer Patojenlere Hızlı Yayılımı**

Enterokoklarda glikopeptid direncinin sadece kendi türü içindeki ya da kendi epitetler arasındaki aktarımı değil, tür ve epitetlerin dışında farklı cinslerdeki patojenlere dahi aktarılabilir olduğunu kanıtlayan çalışmalar vardır. (Appelbaum ve Bozdoğan, 2004; Gemmel, 2004). Direnç genlerinin sadece laboratuvar ortamında transfer yetenekleri değil, hastane ortamlarında da vakalardan izole edilen vankomisin direnci olan diğer türler ve cinslerin bulunduğu da gösterilmiştir. Hastane kökenli *E. gallinarum* izolatu ile gerçekleştirilen bir çalışmada, vanA fenotipi gösteren direnç genleri tespit edilmiş ve PCR ile dizileme yapılması sonucunda konjugasyon yeteneği bulunan, 10.8kb moleküler ağırlıklı Tn1546'ya benzer bir transpozonun varlığı belirlenmiştir. Konjugasyon aktırılabilirliği ile ilgili yapılan çalışmalarda direnç genlerinin *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerine aktarılabilirdiği saptanmıştır. Genelde vanC tipi dirençlilik ile düşük düzey intrinsik direncin gösterilmesi beklenen *E. gallinarum* türünde diğer bir direnç tipi olan vanA tipi direnç genleri ile karşılaştırılması, vankomisin direncinin bu genin türler arasında kolay bir şekilde aktarılabilirdiğine ve yayılımın tehlike boyutlarının ne aşamaya ulaştığının göstergesidir (Biavasco ve ark. 2001; Camargo ve ark. 2004).

*vanA* geninin enterokoklar dışında *Staphylococcus aureus*'a konjugasyon yolu ile transferi laboratuvar ortamında gerçekleştiği gösterilmiştir. Amerika'da 2002 yılında bir hastada ilk defa  $\geq 32\mu\text{g/ml}$  MİK değeri olan enfeksiyon nedeni vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşunun saptandığı ve izole edildiği raporlanmıştır (Weigel ve ark, 2003). İzole edilen suşun enterokok kaynaklı *vanA* tipi dirençli vankomisin direnç geni taşıdığı ve aynı zamanda glikopeptid MİK oranına sahip olduğu da belirtilmiştir. Bunun da vankomisin direncinin sadece enterokoklara değil stafilokoklara ve diğer cinslere de aktarılabilceğini göstermiş ve zamanla yaklaşan vahim durumu gözler önüne çıkarmıştır (CDC, 2002).

Sonuç olarak, bütün dünyada tehlike gösteren bu durum Türkiye'de de yaygın, kontrolsüz ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı ile direnç sahibi olan bakteri suşlarının lehine bir seleksiyon oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalar, ülkemizden izole edilen klinik *Enterococcus* cinsi izolatlarda antibiyotik direncinin artışı göstermektedir. 1980 yılından sonra antibiyotiklere karşı çeşitli yollarla direnç mekanizmaları geliştiren ve yaptıkları enfeksiyonların tedavisinde, mevcut antibiyotik kullanımını kısıtlayan enterokoklarda baş gösteren direncin genetiği, araştırmacıların ilgisindedir. VRE vakalarında dirence ait genetik temelin iyi anlaşılması ile antibiyotik kullanımının daha etkin ve hızlı gelişen dirençli izolatların yayılmasının engellenmesi mümkün olabilecektir (Çöleri ve Çökmüş, 2008).

## **2.8. Enterokok Enfeksiyonları**

Enterokoklar, hastane enfeksiyonlarına neden olan etkenler arasında ön sıralarda yer almaktadır. Varolan bütün enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ından *E. faecalis*, %5-10 gibi bir oranından ise *E. faecium* sorumludur. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium* ve *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türleri klinik örneklerin sadece %5'inden izole edilmiştir (Başustaoğlu ve Aydoğan, 2002). Enterokoklar üriner sistem ve yara enfeksiyonları başta olmak üzere; endokardit, salpenjit, endometrit, peritonit, safra yolu enfeksiyonları, karın içi abseleri, bakteremi bazen de menenjitte neden olabilecek ciddi enfeksiyonlara sebebiyet verebilir (Facklam ve Sahm, 1995).

### **2.8.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları**

Enterokoklar, insanlarda en sık üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur. Gerçekleşen bu enfeksiyonların önemli bir bölümü hastane kaynaklıdır. Komplike

olmayan sistit, renal abselere, pyelonefrit ve prostatit de neden olabilirler (Korten, 2002; Esen, 2004). Üriner enterokok enfeksiyonu ve kolonizasyonu için risk faktörleri anatomik yapı anomalisi, uzun süreli sonda kullanımı ve antibiyotik kullanımınıdır (Başustaoğlu ve Aydoğan, 2002).

Enterokok türlerinin meydana getirdiği agregasyon maddesi ile renal tübüler hücre kültürlerinde organizmanın adezyonunu sağlar. Bu faktör üriner enterokok enfeksiyonu gelişiminde neden olacağı düşünülmektedir (Moellering, 1992).

Ülkemizde yapılmış çok merkezli bir hastane kökenli üriner sistem enfeksiyonları çalışmasında, enterokoklar en sık izole edilen etken olarak beşinci sırada rapor edilmiştir (Leblebicioğlu ve Esen, 2003).

### **2.8.2. Endokardit**

Enterokoklar, bakteriyel kaynaklı endokarditlerin %5-15'ini oluşturur ve endokarditlerin en sık üçüncü nedenidir. Endokardit, altta yatan bir kapak hasarı, damar içi ilaç kullanma alışkanlığı, prostetik kapak gibi eğilimler ile gelişebileceği gibi, hazırlayıcı herhangi bir faktör olmadan dahi gelişebilir. Prostetik kapak endokarditlerinin %6-7'sinden enterokoklar sorumludur. Bu hastalık subakut başlangıç göstermekte ve akut olarak da gelişebilmektedir. Mitral ve aort kapağı en sık olarak tutulmaktadır (Korten, 2002). Diğer sıklıkla baş gösteren genitoüriner problemleri ve dejeneratif kalp hastalığının artışıta olduğu 50 yaş ve üzeri nüfus yoğunlunda rastlanır (Esen, 2004; Taşova ve İnal, 2004).

### **2.8.3. Yara ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları**

Enterokoklar nadir de olsa sellülit veya derin yumuşak doku enfeksiyonları gerçekleştirebilir. Diyabetik ayak enfeksiyonları, yanık, vasküler yetmezlik, dekübitis ülseri gibi yumuşak doku hasarı ile kendini gösteren enfeksiyonlardan, genelde anaeroblar ve Gram negatif basiller ile beraber şekilde izole edilirler. İnvazyon gerçekleşmez, seyrek olarak bakteremi yapabilirler (Esen, 2004).

### **2.8.4. İntraabdominal ve Pelvik Enfeksiyonlar**

Genelde çoklu mikrobiyal tip enfeksiyonlardır. Enterokoklar barsakta bulunan diğer fakültatif ve anaerob bakterilerle beraber bulunur ve enfeksiyonların patojenliğinde rolü tartışmalıdır (Şardan, 2002). Nadiren bakteriyel peritonit nedeni olabilir ve sürekli periton diyalizi uygulanan hastalarda peritonite yol açabilirler.

Salpenjit, endometrit, sezeryan sonrası abse gelişimi gibi pelvik enfeksiyonlara da yol açabilmektedirler (Korten, 2002).

### **2.8.5. Neonatal Enfeksiyonlar**

Yenidoğanlarda VRE'lerin meydana getirdiği hastane bağımlı salgınlar sıklıkla *E. faecalis* (%82) ve *E. faecium*'a (%14) bağlı olarak görülmektedir. Enterokoklar yenidoğanlarda nadiren üriner sistem, sepsis ve menenjit gibi enfeksiyonlara neden olur. Yenidoğanlarda gerçekleşen bu enfeksiyonların ilerlemesinde düşük doğum ağırlığı, erken doğum ve yapılan invaziv girişimler, uzun süreli hastanede kalma durumları ve sefalosporin antibiyotiklerinin kullanımı, risk faktörleri arasındadır (Korten, 2002; Taşova ve İnal, 2004; Çelebi 2008).

### **2.8.6. Diğer Enfeksiyonlar**

Neonatal dönemin haricinde enterokok ilişkili menenjit nadir görülmektedir. Santral sinir sisteminde anatomik defekt, geçirilmiş beyin ameliyatı veya kafa travması gibi durumların var olması sonucunda ortaya çıkar (Korten, 2002; Şardan, 2002).

Enterokoklar, diyabetik ve nondiyabetik hastalarda çok olmasa da kronik osteomyelit etkenidir. Böyle hastalarda enfeksiyon gelişimi çoğunlukla polimikrobiyal temellidir ve enterokoklar ile birlikte *S.aureus* izole edilebilir. Pnömoni ve otitis media da enterokok ilişkili kendini gösteren diğer enfeksiyonlarıdır (Şardan, 2002).

## **2.9. Tedavi**

### **2.9.1. Vankomisin**

Vankomisin, molekül ağırlığı 1500 dalton olan trisiklik polipeptid bir antimikrobiyaldir. Optimum çözünürlüğü 3-5 pH arasında gerçekleşir. Vankomisin bakterisidal etkinliği bulunduğu için, bakteri hücre duvarı sentezinin peptidoglikan polimerlerini oluşturduğu ikinci evrede, kılavuz maddelerden D-alanil-D-alanin bulunduran peptitler ile beraber kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks, transglukozilasyonu inhibe edip peptidoglikan sentezinde yer almasını önler. Membran geçirgenliğini değiştirerek protoplasta zarar verir ve RNA sentezini seçici olarak önleyebilmektedir. Postantibiyotik etkisi de bulunmaktadır (Glew, 1992).

Vankomisinin serumdaki derişimi streptokoklar için bakterisidal etki ederken enterokoklar için bakteryostatik etki gösterir. Altı mg/L ve altındaki vankomisin derişiminde enterokok suşlarının %90'ını üremesi inhibe olur. *E. faecium* izolatlarında vankomisin dirençliliğinin plazmid'e bağlı olduğu ve diğer Gram pozitif bakterilere plasmit aracılığıyla aktarılabildiği gösterilmiştir (Shlaes, 1992). Sistemik enfeksiyonlar intravenöz uygulama ile kullanımı sınırlıdır. Renal fonksiyonu normal olan bir erişkinde 12 saat ara ile 1 gr (15 mg/kg) veya 6 saat ara ile 500 mg (6.5- 8 mg/kg) dozda kullanım uygulanır. Tekrarlanan 6 saat ara ile 500 mg'lık dozdan sonra seruma ait seviye ortalama 8 mg/L'dir. Atılımı böbrekler yoluyla gerçekleşir ve idrarda 100-300 mg/L konsantrasyon seviyesine ulaşmaktadır. Serumun vankomisin klirensi ile kreatin klirensi ilişkilidir ve aralarındaki oranı %70'dir. Beyin ve omurilik zarı ile göz dokularına ve geçiş iyi değildir. Enflamasyon gelişmesi durumunda serum düzeyinin %1-37 arasındaki oranda, beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunabilir ve tedavi edici seviyelere varabilir. Steril vücut sıvılarından plevrada %50; asit, perikard ve eklem sıvısında serum düzeyinin %75'ine ulaşır. Apseye nüfus etmesi iyi, kemiğe gerçekleşen penetrasyonu ise orta seviyededir (Johson ve ark, 1992). Vankomisin oral olarak alındığında absorpsiyon gerçekleşmez. Altı saat ara ile verildiğinde 100-800 mg/L, 8 saat ara ile 500 mg oral verildiğinde barsak lümeninde 1000-9000 mg/L konsantrasyona ulaşır. Böbrek yetmezliği gibi durumlarda doz ayarı gerekmektedir. Karaciğerde yıkılamamasına karşına nedeni bilinemesi de karaciğer yetmezliği olan kişilerde de doz ayarı yapılmaktadır. Gebelerde, obez ve yanıklı hastalarda vankomisin serum yarılanma süresi azaldığından yüksek dozların kullanımı gereklidir (Glew, 1992)

Vankomisin intravasküler uygulanması sonucunda sık görülen yan etkisi kırmızı adam sendromudur. Emilim sayesinde gerçekleşen hıza bağlı gelişen yüz, baş, ense ve göğüs bölgesinin üst kısmında eritematöz flaş ve bununla beraber tehlikeli olabilen nadir kendini gösteren hipotansiyondur (Wallace ve Idfield, 1994). Ancak böyle bir durumla karşılaşmamak için infüzyon öncesi antihistaminik uygulanmasıyla önlenabilir. İntravenöz şeklinde hızlı bir biçimde verilirse kardiyak arrest, cilt döküntüleri, şimik flebit, lökopeni (2. haftadan sonra) görülebilir. Vankomisin diğer önemli yan etkileri başlangıç belirtisi tinnitus ve nefrotoksisite biçiminde kendisini gösterir (Farber ve Moellering, 1983).



### 2.9.2. Teikoplanin

*Actinoplanes teichomyceticus* türünün fermentasyon sonrası ürünlerinden 1970'li yılların bitimine doğru elde edilmiş, Avrupa'da ilk kullanıma 1984 yılında girmiştir. Molekül ağırlığı 2000 daltonudur. Yapısında yer alan yağ asidi ile vankomisinden daha fazla lipofiliktir. Bu özelliği sayesinde diğer glikopeptitlerden ayrılırlar (Somma ve ark, 1984; Trutmann ve ark, 1994).

Teikoplaninlerin etkisi, stafilokok suşları için vankomisin etkisiyle eşdeğer, streptokok ve klostridyum suşlarına 4-8 kat daha fazla etkinlik gösterir. Enterokoklarda vankomisinden daha çok aktif olmakla beraber bakteriyostatik etkinliği vardır. Aminoglikozid ve rifampisin antibiyotikleri ile kombine verilebilir (Öztürk ve ark, 1995).

İntramusküler uygulanabilirliği fizyolojik pH'da çözünübilirliği nedeni ile doğru orantılıdır. Lipofilik yapısı doku ve hücrelere girişini kolaylaştırır. Kemik dokusu, periton sıvısı ve BOS'a ulaşma düzeyleri ile ilgili fazla bilgi bildirilmemiştir. Proteine yüksek bağlanma oranları ve doku penetrasyonu yarı ömrünün (33-48 saat) çok uzun olmasına neden olmaktadır. Normal kan seviyesine ulaşmak için 5 tedavi gününün geçmesi gerekir. MRSA ve MRSE'lerin dirençli Gram pozitif bakterilerin etken olduğu sepsis, pnömoni, endokardit, osteomyelit ve yumuşak doku enfeksiyonu gibi ağır enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (Bibler ve ark, 1987).

### 2.10. Enterokok Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol Önlemleri

Çoğu endojen kökenli olan enterokok enfeksiyonları, barsaklardan translokasyon ile endojen kökenli sistemik enfeksiyona dönüşür (Alp ve Çetinkaya, 2008). Ancak, hastanelerde yatan, kolonize hastalarda ve kontaminasyon ile direkt temasla, personellerin elleriyle kontamine yüzeyler ile temas halinde olması veya kontamine tıbbi aletler vasıtasıyla dolaylı olarak, hastane kaynaklı enfeksiyon şeklinde bulaşın olabileceği gösterilmiştir. Hastane kökenli enterokok ilişkili enfeksiyonların, özellikle tedaviye cevap vermeyen VRE/GRE (Glikopeptid Dirençli Enterokok) gibi multidrug dirençliliği gösteren suşlarla gelişen enfeksiyonların, 1980'li yıllardan sonra devam eden artışın gözlenmesiyle, CDC'ye bağlı Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) hastanelerde artışını sürdüren VRE yayılımını kontrol altına tutabilmek amacıyla, gerekli tedbirleri barındıran bir rehber yayınlamıştır (HICPAC, 1995).

Enterokoklar gastrointestinal ve ürogenital sistemlere ait normal flora üyeleri olmalarından dolayı yaratmış oldukları enfeksiyonların, başından beri endojen bir kaynaktan yayıldığı düşüncesine neden olmuştur. Fakat son zamanlarda özellikle de VRE'lerin hastane kaynaklı yayılım gerçekleştirdikleri gösterilmiştir. Sağlık alanında çalışanların ellerinde, hasta çevresindeki yüzeylerde uzun süre canlı kalabildikleri kolonizasyona neden olabildikleri gösterilmiştir. Önem bakımından özellikle hastanın yatağı ve çevresindeki eşyalar masa, dolap, monitör, infüzyon pompaları, hasta için kullanılan tansiyon aleti, stetoskoplardan VRE izole edilmesi, antibiyotik direnç durumu da göz önüne alındığında önemli bir sorun olduğu ortaya çıkmaktadır. Böyle bir sorunun varolması sadece hastayı değil ayrıca klinisyenlerin de tedavide yaşadığı zorluklar; uzun yatış süresi, maliyet ve diğer hastalara bulaş gibi kapsamları da ilgilendirmektedir. Enterokoklardaki vankomisin direncine bağlı artış, VRE'lerin hastane kaynaklı olan yayılımının önlenmesi ve kontrolü için 1995 yılında HICPAC tarafından bir kılavuz hazırlanmış ve yayınlanmıştır. Kılavuz geçerliliğini hala korumakta ve mevcutta var olan aynı önlemlerin alınmasının yeterli olacağı vurgulanmaktadır. Ülkemizde de Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) vasıtasıyla ulusal standart rehber haline getirilerek hastanelerin kullanımı için kaynaktır. Rehberlerde dört ana başlık önem arz etmektedir:

1. Vankomisinin bilinçli kullanımı,
2. Sağlık kuruluşlarında çalışan personelin eğitimi,
3. Mikrobiyoloji laboratuvarının alması gereken rol,
4. Enfeksiyon kontrol önlemlerinin kurallara uygun olarak uygulanması (Keskin, 2014).

### **2.10.1. Vankomisinin Akılcı Kullanımı**

Mikroorganizmaların antibiyotiklere olan dirençliliğini kontrol etmek, antibiyotik kullanımında ve mikroorganizmaların yayılmasını sağlayan faktörlerin azaltılması için kullanılan ve uygulanan yöntemlere odaklanmıştır. Vankomisin kullanımı, VRE enfeksiyonu ve kolonizasyon oluşturmaya rağmen çeşitli antibiyotiklere de maruz kalınması da bu duruma etkindir (Rice ve ark, 2004). Vankomisinin uygun olmayan kullanımı, vankomisine dirençli *S. aureus* ve *S. epidermidis*'in ortaya çıkmasına neden olabilir. Buna ek olarak, antianaerobik etkinliği olan antibiyotiklerin ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımı da VRE ile ilgili olan enfeksiyon ve kolonizasyon riskini artırma yönündedir. Akılcı bir

şekilde antibiyotik kullanımını yaymak için, HICPAC vankomisin kullanımının uygun olduğu tıbbi personelin ve öğrencilerin eğitiminin önemini vurgulamaktadır (Kurtgöz, 2013).

### **2.10.2. Personel Eğitim Programları**

Hekimler, hemşireler, laboratuvar personeli, öğrenciler, eczane personeli ve hasta bakıcılarını içeren hastane personeli için gerekli olan eğitim programları, hasta bakımının maliyeti ve doğuracağı sonuçları üzerinde patojenin etkileri ve VRE epidemiyolojisiyle ilgili bilgileri barındırmaktadır (Alp ve Çetinkaya, 2008). VRE'nin tespit edilmesi ve kontrol altına altına tutulması, hastane personeli için zorunlu yaklaşımlar ve yüksek performans standartları gerektireceğinden eğitim seansları ve özel bilinçlendirmeler gerekli olabilir (HICPAC, 1995).

### **2.10.3. VRE'nin Tespit, Kontrol ve Raporlanmasında Mikrobiyoloji Laboratuvarının Rolü**

VRE sonucu enfekte veya kolonize olan hastaların erken teşhis edilmesi, VRE'nin hastane kaynaklı yayılımını önlemek için planlanan hastane programlarının önemli bir parçasıdır (Fines ve ark, 1999). Laboratuvarda enterokokları tanımlanması için yapılan testlerle, vankomisin direncini zamanında ve doğru bir biçimde tespit etme yetenekleri, VRE'nin doğuracağı kolonizasyon ve enfeksiyonun kontrolü için önemlidir. Laboratuvar ile enfeksiyon kontrol programı arasındaki işbirliği ve iletişim, kontrol için gerçekleştirilen çabaları büyük bir biçimde kolaylaştıracaktır. Klinikten gönderilen örneklerden VRE izole edildiğinde bu durum hastane için sıradan bir durum değil ise vankomisin direnci, yineleyen antimikrobiyal duyarlılık testleri ile doğrulanmalıdır. Doğrulama amaçlı duyarlılık testleri; hastaya temel bakım veren ve tedavi gördüğü servisteki hasta bakıcı ve enfeksiyon kontrol komitesi personeli, VRE olasılığı konusunda süratle bilgilendirilmelidir. Böylece gerekli izolasyon önlemleri alınabilir (Turabelidze ve ark, 2000; Alp ve Çetinkaya, 2008).

### **2.10.4. Enfeksiyon Kontrol Önlemlerinin Kurallara Uygun Uygulanması**

VRE'nin varolan bir hastadan başka diğer hastalara yayılımını önlemek için HICPAC (1995) tarafından önerilen izolasyon önlemleri şöyledir:

- VRE sonucu enfekte veya kolonize olan hastaları, tekli veya VRE ile ilişkisi bulunan diğer hastalarla aynı odaya konmalıdır.

- VRE ile enfeksiyonu yada kolonizasyonu bulunan hastanın odasına girerken temiz ancak steril olmayan eldiven giyilmeli ve hastanın bakımı esnasında, VRE şüphesi bulunduran materyallere (örneğin dışkı, hasta başı eşyalar) temas sonrasında eldiven değiştirilmesi gereklidir.
- Hastayla ya da hasta odasındaki çevresel yüzeyle temas veya hastada ishal ile ostomi, kolostomi, pansumanla kapatılmamış yara drenajı varsa hastaların odasına girerken temiz önlük giyilmelidir.
- Hasta odasından çıkmadan personel eldiven ve önlüğü çıkarıp, ellerini antiseptik ajanlarla yıkamalıdır. Ellerin kontaminasyonu eldivenden sızıntıyla veya eldivenlerin çıkarılması sırasında meydana gelebilir ve ellerin VRE kontaminasyonu sabunla temizlenmesine etkisizdir.
- Kıyafetlerin ve ellerin hasta odasında VRE kontaminasyonu olasılığı bulunan çevresel yüzeylerle (örneğin hasta başı eşyalar, kapı kolu veya perde) temasa geçilmemesine özen gösterilmelidir (Boyce ve ark, 1994; Çetinkaya ve ark, 2000).

HICPAC tarafından önerilmese de, bazı hastanelerde VRE saptanan hastaların buldukları odalara girerken personelin rutin bir şekilde eldiven ve önlük giymesi talebinde bulunulur. Handwerger ve ark. (1993) diğer mevcut enfeksiyon kontrol önlemlerine ek olarak önlük giyerek odalara girmenin salgını sınırladığını bildirmiştir. İzolasyon önlemlerine ek olarak stetoskop, rektal termometre gibi aletlerin kullanımı, tek bir hastaya veya hasta gruplarına özel olmalıdır. Bu cihazlar başka hastalarda da kullanılacak ise kullanmadan önce yeterince temizlenmeli ve uygun kurallarla dezenfekte edilmelidir (Boyce ve ark, 1994).

#### **2.10.5. Sürveyans Kültürleri**

Başarılı bir VRE kontrol programlarının temel bileşeni olan gastrointestinal kolonizasyonu saptamak için, hastalardan alınan sürveyans kültürlerinin salgınlar sırasında yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Kolonize hastaları tanımlamadaki diğer uygulamalar ise VRE için *C. difficile* toksin tayini adına gönderilen dışkı örneklerinin taranması, ayrıca yüksek riskli kurumlardan (hastaneler ve endemik VRElerin olduğu bakım merkezleri) kabul edilen hastalardan alınan rektal veya perirektal sürüntü örneklerinin taranmasını içerir. Kolonize kişilerin tespitinde

perirektal kültürler, rektal kültürlerle benzer duyarlılıkta olduğu görünmektedir (Alp ve ark, 2008).

#### **2.10.6. Gastrointestinal Kolonizasyonu Ortadan Kaldırmak İçin Girişimler**

Vankomisin dirençli enterokokları elemine etmek; kolonizasyon bulunanlarda enfeksiyon riskini azaltmak, hastanelerde mevcut VRE rezervuarını sınırlamak ve enfeksiyon kontrolü için yapılan ya da yapılacak harcamaları azaltmaktır. Ancak, kalıcı şekilde VRE'yi ortamdan kaldıracak antimikrobiyal tedavi henüz bilinmemektedir. Novobiosin - tetrasiklin veya novobiosin - doksisisiklin kombinasyonu, VRE eliminasyonunda başarı göstermemiştir. Oral basitrasin, ramoplanin ve novobiosin antibiyotiklerinin kullanımında kısıtlı başarı elde edilmiştir. Bazı hastalardan bu girişimlere olumlu geri dönüş alınmış gibi görünse de, herhangi bir uygulama gastrointestinal sistemden VRE'yi yok etmede eşit düzeyde etki yaratamamıştır (Çetinkaya ve ark, 2000; Akçimen, 2010).

#### **2.11. Enterokok Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi**

Enterokoklar, neden oldukları hastane enfeksiyonu salgınlarından dolayı dünyadaki önemi dikkate değer şekilde artmıştır. Gerçekleştirilen ilk epidemiyolojik izlem çalışmaları sonucunda, enterokokların hastadan hastaya ve daha da ileri bir seviye olan hastaneler arası yayılabilmesi ve bu bakterilerin barsak florasında normal olarak bulunmasının esansiyel risk faktörü olduğu, bu sebeple de hastane enfeksiyonlarında %85-95'lik oran ile en yüksek insidansa sahip olan insan dışkılarından en çok izole edilen tipin *E. faecalis* türü olduğunu, ikinci olarak en sık görülen *E. faecium*'un %5-10 oranı ile takip ettiği gösterilmiştir (Çetinkaya ve ark, 2000; Zirakzadeh ve Patel, 2006). İngiltere ile Fransa'da 1986 yılında vankomisine dirençli enterokokların meydana getirdikleri enfeksiyonların kliniğine ilişkin ilk bilgilerin açıklanmasından ardından, 1988 yılında direnç paternleri tespit edildi. Bu tespitin yayımlanmasından sonra enterokoklara bağlı hastane ilişkili enfeksiyonların epidemiyolojisinde iki önemli değişiklik olan; insidansdaki hızlı artış ve tür dağılımlarında yaşanmıştır (Uttley ve ark, 1988; Leclercq ve ark, 1988). Vankomisin'in 1989 yılından itibaren hastanelerde yaygın olarak kullanılmaya başlandığı, başta Avrupa ülkeleri ve ABD'den glikopeptid grubu antibiyotikler olmak üzere, beta-laktam ve aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı direnç gösteren çok sayıda kliniğe ait izolat ve hasta bildirimleri yapılmıştır. VRE'ye neden

olan türlerinden *E. faecium*'un klonal seleksiyon sonucunda, hastane ortamına tek olarak veya stafilocoklarla birlikte hastane enfeksiyonlarındaki görülme sıklığı hızla arttığı tespit edilmiştir. CDC, 1990-1992 yılları arasında hastane enfeksiyonları içinde, *Escherichia coli* ve stafilocoklardan sonra enterokokların yaklaşık %10'luk görülme olasılığı ile üçüncü sıklıkta yer aldığı bildirilmiştir (Chou ve ark, 2008; Huckabee ve ark, 2009). Çetinkaya ve ark. (2000) ile Chou ve ark. (2008) tarafından farklı hastanelerde gerçekleştirilen çalışmalarındaki sonuçlarının açıklandığı çalışmalarda, enterokokların hastane bağıntılı olan cerrahi yara enfeksiyonlarının % 13'ü, bakteriyemilerin %9'u, üriner sistem enfeksiyonlarının %12-16'sından sorumlu olduklarını belirtmişlerdir. Enfeksiyonların % 60'dan fazlasının da eksojen kaynaklı olduğunu ve %50'den fazlasının da yoğun bakım ünitelerinde görüldüğü belirtilmiştir. ABD'den NNIS'nin verilerinin sonucunda; hastanelerde 1989-1997 yılları arasındaki VRE izolasyon oranlarının; yoğun bakım ünitelerinde görülen hastane enfeksiyonlarında %0,4 oranından %23,2'ye, diğer ünitelerde ise %0,3 oranında %15,4'e yükseldiğinin bildirimi yapılmıştır (Martone, 1998). NNIS (1998) raporuna göre yoğun bakım servislerinde mevcut hastane enfeksiyonlarında %22,6 olan vankomisin dirençli enterokok görülme sıklığını, 1999 yılında %25'e ve 2003 yılında ise %28,5 gibi bir orana yükseldiği gösterilmiştir. Verilen bu bildirimlerin haricinde genellikle ABD'de, 2000'li yılların başlarında hastane enfeksiyonlarında vankomisin dirençli enterokok görülme sıklığı %25'in üzerinde yer aldığı, hastanede yatan hastalarda vankomisin dirençli enterokok kolonizasyon oranının da %5-18 arasında değiştiği bildirilmiştir. Ancak hastane dışındaki popülasyonda intestinal bağlantılı kolonizasyon olmadığı bildirilmiştir (Bonten ve ark, 2001).

Kanada'dan bildirilen 7 yıllık VRE sürveyans raporuna göre; 2001-2003 yılları arasında enterokok izolatlarında %0,5 oranında olan VRE görülme sıklığı, 2006 yılında %3,3 oranına ulaşmıştır (CNISP, 2006). Werner ve ark. (2008), Avrupa'da görülen hastane enfeksiyonlarında, ABD'den küçük farkları olmakla beraber benzer artış eğilimi görüldüğünü belirtmiştir. 2014 EARSS verilerine göre, vankomisine dirençli *E. faecalis* izolatlarının oranı %8,5 (İzlanda) ile %76,5 (Romanya) arasında değişkenlik göstermektedir (Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe, 2015). Bu oran Fransa'da %13,7, Yunanistan'da %20,1, İtalya'da %55,3, Almanya'da %33,6 ve İngiltere'de %30,9 olarak belirlenmiştir. *E. faecium* izolatları arasında ise vankomisin direnç oranı yüzdesi sıfırdan (Estonya, Finlandiya, İzlanda ve Malta) %45,1'e (İrlanda) kadar ülkeler arasında değişkenlik göstermektedir. Bu oran

Fransa'da %0,5, İtalya'da %8,5, Almanya'da %9,1 İngiltere'de %21,3 ve Yunanistan'da %26,9 olarak bildirilmiştir. 2011-2014 yılları arasındaki artış ya da azalış yönelimi bakımından önemli artış Bulgaristan, Hırvatistan, Danimarka, İtalya ve İngiltere'de gözlemlenirken bu orandaki en büyük düşüş Belçika, Fransa ve Almanya'da belirlenmiştir (Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe, 2015).

Türkiyede 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi'nden Vural ve ark. (1999) tarafından, ilk vankomisin dirençli *E. faecium* bildirimi yapılmıştır. Ülkemizde VRE bildirisi olarak kendine yer bulan bu ilk suş, malign histiyositozis tanısı bulunan, bronkopulmoner enfeksiyonlu bir bebekte, plevra sıvısından izole edilmiştir. Aynı yıl içerisinde diğer merkezlerden yapılan diğer direnç bildirimleri takip etmiştir (Başustaoğlu ve ark, 2001; Çolak ve ark, 2002).

CDC'nin alt komitesi olan HICPAC, 1995 yılı içerisinde VRE'lerin artarak ilerleyen yükselişini önlemek ve kontrol altına almak adına ek bir rehber yayınlamak zorunluluğunda kalmıştır (HICPAC, 1995). Maryland Sağlık ve Mental Hijyen Bölümü Epiemiyoloji ve Hastalık Kontrol Programı (Perencevich ve ark, 2004); uzun dönem tedavi tesislerinde VRE kontrol ve koruma rehberinde yapılan yayınlara rağmen VRE'lerde artış eğilimi devam ederek sürmüş, görülme sıklığındaki artış mortalite oranlarına da yansımıştır. Sonuç olarak ise VRE'ye bağlı enfeksiyonların mortalitesi VSE'ye bağlı gelişen enfeksiyonlara göre, 2 kat artarak, %39 oranlarına kadar yükselme göstermiştir (Zirakzadeh ve Patel, 2006).

Enterokokların hastane kaynaklı olarak görülme sıklığındaki artış, hastanelerde sunulan hizmet kalitesine bağlı olarak yatış alan hastaların özelliklerinin de etkili olduğu gösterilmiştir. Hastalığı ciddi seviyelerde olan immünsüprese hastalar, intraabdominal veya kardiyotorasik cerrahi uygulanan hastalar, kanser kemoterapisi alanlar, transplantasyon hastaları, vankomisin, III. kuşak sefalosporinler, karbepenemler ve 5-nitroimidazol gibi geniş spektrumlu antibiyotik kullanma ihtiyacı olan hastaların kabul edildiği, komplike tanı konulan ve bu tanılara da uygun tedavi girişimleri küçük ya da orta ölçekteki bir şehir hastanesine oranla uygulandığı, daha büyük sağlık kuruluşlarında enterokok enfeksiyonlarının görülme olasılığını arttırır. Transplantasyon olacak hastalarda mevcut endojen florada VRE taşıyıcılık oranı %3,4 seviyesindeyken; transplantasyon gerçekleştikten sonra hastalardaki VRE oranının %44'e çıktığı bildirilmiştir (Bakır ve ark, 2001). VRE veya GRE görülme sıklığındaki artışın önemli sebebi olarak, Avrupa ülkelerinde bulunan kümes hayvanlarının günlük yemlerine gelişim faktörü olarak eklenen avoparcin benzeri

glikopeptit türüne ait olan antimikrobiyallerdir. Avrupadaki tavuk cesetleri, çiftlik hayvanları, diğer et ve bu etkerden elde edilen ürünleri ile atık su örneklerinde *vanA* tipindeki VRE ciddi seviyelerde problem haline dönüşmüştür. Avrupadaki bu zengin rezervuar çeşitliliği sayesinde, gıda zinciri vasıtasıyla insanlara da yansımıştır. Toplumda VRE kolonizasyon oranı %2-12 olarak bildirilmiştir. 1994 yılından itibaren bir çok ülkede kümes hayvancılığında dahil tüm gıdasal yetiştiricilikte avoparcin kullanımının yasaklanması ve hastalarda glikopeptit grubuna ait antibiyotik kullanımının da kısıtlanması sonucu Avrupada bildirilen VRE oranlarında azalmalar da bildirilmiştir (McDonald ve ark, 1997; Wegener, 1998).

Transpozon Tn-1546 ile kodlanan *vanA* tipi direnç, hayvanlar arasında VRE'nin klonal gelişimini arttırmış ve gıda zinciri ile insana bulaşarak gastrointestinal kolonizasyonu yükseltmiştir. 1997 yılına kadar, ABD'de kümes hayvanları ve hastane yatış geçmişi olmayan kişilerde yüksek düzey dirençli (MİK>32 mg/L) VRE tespit edilmemiştir. 1994 yılında Almanya'da sağlıklı insanların %12'si gibi bir oranla VRE taşıyıcılığı bildirilmiştir (Aktaş ve Derbentli, 2009). Meydana gelen bu farkın, ABD'de hayvan yemlemede kullanılan yemlerin glikopeptit grubuna ait antibiyotik kullanımının olmamasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Buna dayanarak ABD'de görülen VRE kökenli hastane kaynaklı olan enfeksiyonlarında en temel rezervuarın endojen florasında kolonizasyonu olan hastalar olduğu tespit edilmiştir. ABD'deki hastanelerin glikopeptid grubu antibiyotiklerin kullanımının çoğunlukta olması, VRE'lerin hastane enfeksiyonlarındaki görülme sıklığı Avrupa ülkelerine göre daha yüksek bulmuştur (McDonald ve ark, 1997; Aktaş ve ark, 2009).

## **2.12. Enterokoklarda Antimikrobiyal Direnç**

Hastane kaynaklı enterokokal ilişkili enfeksiyonlar, tedavi altınaki hastaların antibiyotik kullanımı sonrasında intestinal florasında duyarlı suşların yok olup antibiyotik dirençli, sitolitik toksin gibi virülans özellikleri bulunan suşların yerlerini almasıyla başlar. İçsel kökenli çevreye translokasyonla yayılan bu suşlar, duyarlı hastalarda dış kaynaklı enfeksiyonlara neden olurlar. Antibiyotik direnci intestinal florada suşların çoğalmasını kolaylaştırırken, sitolitik toksin ve jelatinaz gibi virülans faktörleri doku istilasına neden olmaktadır (Klare ve ark, 2003; Aktaş ve Derbentli, 2009). Enterokoklar, klinik kullanımda olan birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olduğundan dolayı hiçbir antibiyotik tek başına enterokoklara karşı bakterisidal etkinlik barındıramaz. Mutasyon veya plazmid/transpozon aracılığıyla genetik



materyalin transfer edilmesi, antibiyotiklere karşı direnç kazanabilme anlamına gelmektedir. Bu nedenle ciddi enterokok kaynaklı enfeksiyonların tedavisi güçtür. Etkiyi güçlendirebilmek adına kombinasyon tedavileri uygulanmaktadır (Korten, 2002; Şardan, 2004).

Enterokoklarda antimikrobiyal direnç iki ana başlık altında incelenebilir (Moellering, 2005).

### **2.12.1. Doğal (İntrensek) Direnç**

Bu tip direnç türlerin tümünde mevcut olan genetik tabanlı yani kromozomal olarak varolan dirençtir. Enterokoklar; sefalosporinlere, penisilinlere, linkozamidlere, aminoglikozidlere (düşük düzeyde) doğal olarak dirençlidir.

#### **2.12.1.1. Beta - Laktam Direnci**

Enterokoklardaki doğal penisilin direnci;  $\beta$ -laktam antibiyotiklerle olan düşük bağlanma ile kendisini gösterir. Bu durum, penisilin bağlayan protein (PBP) 5 enziminin varlığı ile ilişkilidir. Penisiline olan düşük düzeyde intrensek direnç PBP5'in afinitesinde gerçekleşen azalma sonucunda kendini ortaya çıkarır. *E. faecium* suşlarında dirençli suş oranı artış gösterirken, penisilin bağlayan proteinlerinin afinitesi son yıllarda azalma göstermiş ve suşlarının %85-90 gibi bir oranla ampisiline dirençli hale gelmiştir. *E. faecalis* suşlarında ampisilin direnci %2-3 oranındadır. *E. faecalis* streptokoklara göre, penisilin antibiyotiklerine 10-100 kat duyarlılığı az iken *E. faecium*, *E. faecalis*'ten 4-16 kat daha az duyarlıdır (Murray, 1990).

Çoğu *E. faecalis* penisilin ya da ampisilinin 1-8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonları sayesinde önlenirler. *E. faecium*'da büyümenin engellenebilmesi için ortalama 16-64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gereklidir. Yapılan bu tür konsantrasyon denemelerine rağmen bazı izolatlar daha dirençlidir (Murray, 1997). *E. faecium*'un PBP5 enzimini üretmemesi ya da kromozomdan mutasyonlar sonucu kaybolması, yüksek penisilin dirençli suşun, penisiline aşırı duyarlı duruma gelmesine neden olur (Fontana ve ark, 1985). İzole edilen tüm enterokoklar, diğer hücre duvarına etkili ajanlara karşı;  $\beta$ -laktamlara, vankomisin ve teikoplaninde tolerans gösterir. Kısa süreli olsa bu ajanlara maruz kalınması hızla tolerans geliştirilmesine neden olmakta ve bu ajanlar enterokoklara karşı bakteriyostatik etki göstermektedir. Tek başına üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılabilseler dahi bakterisidal aktivite gerektiren endokardit,

menenjit gibi enfeksiyonlarda standart kombinasyon tedavisi kullanılmalıdır. Sinerjistik bakterisidal etki göstermesi için bu antibiyotiklerin aminoglikozidlerle kombinasyonu halinde kullanılması gerekmektedir (Robert ve ark, 2005).

#### **2.12.1.2. Aminoglikozid Direnci**

Düşük düzeyde aminoglikozid direnci görülen enterokoklarda, bu grup ilaçların bakteri içerisine ulaşımının az olmasından kaynaklıdır. Aminoglikozid grubu ilaçlar, enterokoklarda mevcut sitokrom enzimleri olmadığından dolayı, enerji bağımlı mekanizma ile bakterinin hücre duvarından geçtiklerinden geçirgenlik azalmaktadır. Aminoglikozidler,  $\beta$ -laktam'lar gibi hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotikler ile kombine edilirse, sinerjistik etki oluşacak ve bunun sonucunda hücre duvarından kolay geçebilecek, MİK değerleri kendisini gösterecek derecede düşecektir (Klare ve ark, 2003).

#### **2.12.2. Edinsel (Kazanılmış) Direnç**

Edinsel direnç, genellikle DNA'da gerçekleşen mutasyon ya da yeni bir DNA segmentinin mevcut DNA'ya translokasyonu sonucunda gelişir. Enterokoklarda yeni DNA segmenti transferinde en sık görülen yol konjugasyondur (Şardan, 2004).

##### **2.12.2.1. Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Kazanılmış Direnç**

Enterokokların iki ayrı direnç mekanizması; kromozomal olan *E. faecium* suşlarında görülen penisilin afinitesinin azalması sebebiyle, PBP-5'in miktarının artması ile kendisini gösteren dirençtir ve direnç mekanizması sayesinde beta-laktamaz üretimidir. Bu iki yolla beta-laktam antibiyotiklere direnç kazandığı saptanmıştır. 1981 yılında ABD'de beta-laktamaz oluşturan ilk suş tanımlanmıştır (Murray, 1983; Derbentli, 1998; Lefort ve ark, 2000). Ülkemizde de yapılan çalışmalarda beta-laktamaz oluşturan suşlar saptanmıştır (Moaddab ve Töreci, 2000).

##### **2.12.2.2. Aminoglikozid Antibiyotiklerine Kazanılmış Yüksek Düzeyde Direnç**

Enterokoklarda kazanılmış yüksek düzeyde aminoglikozid direncinin (YDAD) oldukça geniş bir yayılımı vardır.

Yüksek düzeyde aminoglikozid direnci 3 mekanizma ile meydana gelir:

1. Ribozomal bağlanma alanında değişiklik

## 2. Aminoglikozid modifiye edici enzim üretimi

### 3. Aminoglikozid iletiminin değişmesi

Tek bir aminoasit değişikliği olan ribozomal proteinde, değişikliğin meydana geldiği ribozomda antibiyotiğe karşı düşük afinite gösterir. Ribozomal bağlanma bölgesinde değişiklikle meydana gelen direnç enterokoklarda bildirilir. Klinik olarak nadir görülür ve diğer aminoglikozidlere karşı çapraz direnç gerçekleştirilmemektedir. Aminoglikozid taşınımının değişmesi sonucunda oluşan direnç paterni de ender görülmekte ve kontrolü kromozomal genlerle yapılmaktadır. YDAD'nin enterokoklarda en çok rastlanan aminoglikozid modifiye edici enzim üretimi mekanizmasıdır. Plazmid ve transpozon kaynaklı enzimleri kodlayan genler ile gerçekleşir. Aminoglikozid modifiye edici enzimler, sitoplazmaya geçen ilaçları eylemsizleştirecek ölçüde sitoplazmada yer bulurlar. Asetiltransferaz, adeniltransferaz, fosfotransferaz olmak üzere üç tip aminoglikozid modifiye edici enzim bulunmaktadır. Gentamisin, kanamisin ve netilmisin gibi antimikrobisidler, streptomisin hariç, aminoglikozid modifiye edici enzimleri kodlayan direnç geni bulundurulur. Eğer enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci saptanmışsa, verilecek olan kombine tedavide sinerjistik etkinin herhangi bir yardımı olmaz. YDAD belirlemek var olduklarını saptamak için temel olarak kullandığımız disk difüzyon, agar dilüsyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır (Lefort ve ark, 2000; Başustaoğlu ve Aydoğan, 2002).

### 2.12.2.3. Glikopeptid Antibiyotiklere Karşı Direnç

Glikopeptidler, hücre duvarı sentezini bozmak için hücre duvarının sentezinde peptidoglikan polimerleri oluşturacak kılavuz maddelerinden D-ala-D-ala terminal ucuna bağlanır. VREler ligaz enzimi sayesinde D-ala-D-ala terminal ucunun yapısında değişiklik meydana getirerek D-ala-D-laktat veya Dala-D-serin'i oluşturur. Değişikliğin meydana geldiği bu terminal uca vankomisin bağlanma affinitesi azalır ve hücre duvarı yapımı devam eder. Önceleri izolatların MİK değerlerine göre direncin sınıflandırılması yapılmaktaydı. Günümüzde sınıflandırma spesifik ligaz genlerinin varlığına göre yapılmaktadır. *VanA* ve *vanB* tipi direnç; D-ala-D-laktat, *vanC* tipi direnç ise D-ala-D-serin üretimi ile alakalıdır (Şardan, 2002; Başustaoğlu, 2004). Ülkemizde ilk VRE olgusu, 1998 yılında Antalya'dan bildirilmiş olup (Vural ve ark, 1999), Öngen ve ark. (1999), Başustaoğlu ve ark. (2001) da çeşitli hastanelerden bu tür olguları bildirmiştir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Kullanılan Gereçler

##### Makine ve teçhizat:

- Biyogüvenlik Kabini (Nüve LN 120, Türkiye)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye )
- Derin Dondurucu (Bosch, Almanya)
- Görüntüleme Cihazı ve Programı (Quantum Vilber Lourmat, Fransa - Vilber Lormat Software, Fransa)
- Hassas Terazi (Densi Ufo Plus JW, Kore)
- Isıtıcılar (Biosan TDB 120 Thermo Block, Letonya ve Biosan TDB 100 Dry Block, Letonya)
- İnkübatör (Memmert, Fransa)
- Jel Elektroforez Cihazı ve Tankı (Wealtec Corp. Elite 300 PLUS, Amerika)
- Karıştırıcı (Hot & Stirrer MS300HS, Kore)
- Mikro Santrifüj ve Vorteks Cihazı (Biosan FVL-2400N Combi-Spin, Litvanya)
- pH metre cihazları (HANNA instruments HI 2211, Romanya ve Docu Meter pH, Almanya)
- Santrifüj Cihazı ( Eppendorf Centrifuge 5424, Almanya)
- Thermal Cyler Cihazı (2720 Thermal Cyler by Life Technologies, Singapur)
- Vorteks (Heidolph REAX, Almanya)

##### Sarf malzemeler:

- % 5 Koyun Kanlı Agar (Salubris, Türkiye)
- Bile Eskülin Agar (Himedia, Hindistan)
- Brain Heart Infusion Broth (BD, Fransa)
- DNA izolasyon kiti ( İnvitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit)
- Etil Alkol (Alkokim, Türkiye)
- HCL (Merck, Almanya)
- Lizozim (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Taq DNA Polimeraz (İnvitrogen, ABD)
- PCR Buffer (10X; İnvitrogen, ABD)
- MgCl<sub>2</sub> (İnvitrogen, ABD)
- dATP (İnvitrogen, ABD)

- dCTP (İnvitrogen, ABD)
- dGTP (İnvitrogen, ABD)
- dTTP (İnvitrogen, ABD)
- *vanA* R-CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA (İnvitrogen, ABD)
- *vanA*, F-CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A (İnvitrogen, ABD)
- *vanB* F-GTG ACA AAC CGG AGG CGA GGA (İnvitrogen, ABD)
- *vanB* R-CCG CCA TCC TCC TGC AAA AAA (İnvitrogen, ABD)
- *vanC* F-GAA AGA CAA CAG GAA GAC CGC (İnvitrogen, ABD)
- *vanC* R-ATC GCA TCA CAA GCA CCA ATC (İnvitrogen, ABD)
- DNA Marker ( 100 bp DNA ladder, İnvitrogen, ABD)
- Agaroz (İnvitrogen, ABD)
- Etidium Bromid (Sigma, Almanya)
- Tris Buffer EDTA (TBE, Gibco UltraPure, İngiltere)
- TritonX (Thermo Fisher Scientific, ABD)

### 3.2. Materyal

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına, Haziran 2013 - Mart 2014 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik materyallerden izole edilen ve otomatize sistem (Vitek2, Biomerieux, Fransa) ile tür düzeyinde tanımlanmış, CLSI standartları kullanılarak antibiyogram testleri değerlendirilmiş 200 enterokok suşu çalışmada kullanıldı. Bu suşlar arasında aynı hastadan birden fazla alınan örnekten izole edilenler bulunmamaktadır.

Rutin laboratuvar işleyişinde, tanı için gönderilen klinik materyaller ticari olarak temin edilen %5 koyun kanlı agar besiyerine ekilerek 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda üreyen küçük non hemolitik veya alfa hemolizli kolonilerden, Gram boyama için yayma preparatlar hazırlanmıştır. Gram boyama yöntemiyle Gram pozitif kok şeklinde görünen bakterilerden katalaz testi ve PYR testi yapılmıştır. Katalaz testi negatif, PYR testi pozitif olan kolonilerden otomatize sistem (Vitek-2, Fransa) ile identifikasyonu ve antibiyogramı gerçekleştirilmiştir. İzolatlar %16 gliserinli nutrient buyyon içinde -80°C'de saklanmıştır.

### 3.3. Yöntemler

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2014-17 no'lu kararı ve 17.01.2017 tarih ve 18920478-202.03.02-E.6384 no'lu yazısı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Daha önce izolasyonu, identifikasyonu ve antibiyogramı yapılarak saklanmış 200 enterokok suşu canlandırma amacıyla %5 koyun kanlı agar besiyerinde tekrar üretildi. Canlandırılan suşların, saflık kontrolü ve temel identifikasyon testlerinin teyidi amacıyla katalaz, PYR, safra eskülin agarda üreme ve tuz tolerans testleri uygulandı. Safra eskülin agar ve %6,5 NaCl buyyon'a ekim yapılarak, 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Eskülini hidrolize etmiş (siyah halo yapan koloniler) ve %6,5 NaCl buyyon'da üreyen bakteriler DNA izolasyonu ve PCR amacıyla kullanıldı.

#### a) Katalaz Testi

Katalaz testi, bakteri süspansiyonu üzerine %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmesi sonrasında enzim mevcut ise, 10 saniye içinde köpük ya da hava kabarcıkları gözlemlendi.

#### b) PYR Testi ( L-pyrrolidonyl-B-naphthylamide Hidroliz Testi)

Kullanılan kit ile PYR emdirilmiş filtre kâğıdı üzerine, distile su emdirildi ve enterokok şüpheli koloniden 2-3 adet konuldu. PYR broth damlatılıp 5 dakika beklendi ve kırmızı renk oluşması pozitif ve sarı renk oluşması negatif olarak değerlendirildi.

#### c) Safra Eskülin Testi Deneyi

Safra eskülin agar (Himedia, Hindistan) hazırlandı ve daha önce pasaj alınmış saf koloniden özeyele inokulum alınıp besiyerine ekildi. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrası besiyerinde siyahlık meydana gelmesiyle, test pozitif olarak değerlendirildi.

#### d) Tuz Tolerans Testi (%6,5'lük NaCl Buyyon)

BHI buyyon (BD, Fransa) içinde %6,5'lük NaCl içerecek şekilde hazırlanan besiyerine 2-3 koloni ekilip 3 saat 37°C'de inkübe edildi ve üreme olanlar pozitif değerlendirildi.

### 3.3.1. Direnç Genlerinin Belirlenmesi

#### 3.3.1.1. DNA İzolasyonu

Enterokok suşlarının DNA izolasyonu, ticari olarak temin edilen DNA ekstraksiyon kiti (PureLink Genomic DNA Kit – ABD) kullanılarak üretici firmanın tarifine uygun olarak gerçekleştirildi.

PureLink Genomic DNA Kit içeriği:

1. Lizis/Bağlanma Tamponu - 50ml
2. Sindirme Tamponu - 45ml
3. Yıkama Tamponu 1 - 50ml
4. Yıkama Tamponu 2 - 37.5ml
5. Elüsyon tamponu - 50ml
6. RNase A - 5ml
7. Proteinaz K - 5ml
8. Spin kolonları - 5x50
9. Toplama Tüpleri - 5x100

Isı bloğu 37°C'ye hazırlandıktan sonra, mikrosantrifüj tüpüne 900µl SF (Serum Fizyolojik) konuldu ve saf kültürden öze dolusu koloni eklenerek maksimum devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak, geriye kalan pellete daha önceden hazırlanan 20 mg/ml lizozim içeren sindirme tamponuna (25mM Tris-HCl p8.0, 2.5mM EDTA, %1 Triton-X 100) her örnek için 180µl olarak eklendi. Kısa bir vorteks işlemi ile lizozim sindirme tamponu ve pellet homojenize bir şekilde karıştırıldı. Bu işlemin ardından karışım 37°C'de 30 dakika süresince ısı bloğu içinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından ısı bloğu 55°C'ye ayarlanıp ısınması beklendi. Bu süre içinde mikrosantrifüj tüpüne 20µl Proteinase K da eklendi ve kısaca vorteks işlemine tabi tutuldu. Sonrasında 200µl lizis/bağlanma tamponu da eklendi ve yine kısaca vorteks işlemine tabi tutuldu. 55°C'ye ulaşan ısı bloğuna mikrosantrifüj tüpleri konarak 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 200µl %96-100'lük etanol daha eklendi. Homojenize bir çözelti elde etmek için lizat 5 saniye boyunca vortekslendi. Kutu içeriğinde gelen paketten toplama kolonları ile spin kolonları çıkarıldı ve birbirlerinin içine yerleştirildi. Yaklaşık olarak 600µl elde edilen lizat spin kolona aktarıldı. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10.000 rpm devirde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası eski toplama kolonu atılarak

yenisi takıldı. Spin kolona yıkama solüsyonu 1'den 500µl eklendi. Yine oda sıcaklığında 10.000 rpm devirde 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası eski toplama tüpü atılarak yenisi takıldı ve yıkama solüsyonu 2'den 500µl eklendi. Üç dakika boyunca maksimum devirde santrifüj edildi. Kullanılan son toplama kolonu da atılarak steril bir mikrosantrifüj (1.5ml) tüpü takıldı. Spin kolona 200µl elüsyon tamponu eklendi. Bir dakika oda sıcaklığında bekletilip sonrasında 1 dakika yine oda sıcaklığında maksimum devirde santrifüj edildi. Bu işlemde spin kolondan mikrosantrifüj tüpüne geçen izole edilmiş genomik DNA, PCR'da kalıp (template) DNA olarak kullanıldı.

### 3.3.1.2. *vanA*, *vanB* ve *vanC* Genlerinin Amplifikasyonu

*vanA*, *vanB* ve *vanC* genlerinin amplifiye edilmesi için Clark ve ark. (1993) tarafından açıklanan PCR yöntemi uygulandı. Hedef spesifik primerler (Tablo 3) ve termal döngü bu çalışmada bildirildiği şekliyle PCR amplifikasyonu, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

**Tablo 3.** Kullanılan primerler ve dizileri (Clark ve ark, 1993).

Hedef Genler	Primer Dizileri (5' → 3')	Amplikon büyüklüğü (bp)
<i>vanA</i>	F-CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A R-CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA	1030
<i>vanB</i>	F-GTG ACA AAC CGG AGG CGA GGA R-CCG CCA TCC TCC TGC AAA AAA	433
<i>vanC</i>	F-GAA AGA CAA CAG GAA GAC CGC R-ATC GCA TCA CAA GCA CCA ATC	796

Toplam 25µl olan bir amplifikasyon tüpünün içeriği için yapılacak master miks bir örnek için;

- ddH<sub>2</sub>O 18,125µl (Gibco by Life Technologis, İngiltere)
- 10X PCR tamponu 2,5µl (Invitrogen, ABD)
- MgCl<sub>2</sub> (50mM) 0,75µl (Invitrogen, ABD)



- dNTP (10mM) 0,5µl (Invitrogen, ABD)
- Primer R-F (25pmol/her bir primer için) 0,5µl (Invitrogen, ABD)
- Taq DNA Polimeraz 0,125µl (Invitrogen, ABD)
- Ekstrakte edilmiş DNA'dan 2 µl template olacak şekilde gerekli malzemeler hazırlanarak karışım elde edildi.

PCR'da pozitif kontrol olarak fenotipik direnç özellikleri ve direnç genlerini içermesi bakımından, iyi karakterize edilmiş izolatların DNA'sı template olarak ve negatif kontrol olarak ise DNA template yerine ddH<sub>2</sub>O içeren karışım kullanıldı.

Amplifikasyon için gerekli olan termal döngü programı;

- 94°C 5 dakika boyunca ilk döngüden sonra
- 94 °C 30 saniye denatürasyon için
- 58 °C 30 saniye primerlerin bağlanması için
- 72 °C 30 saniye bağlanan primerlerin uzaması için

Toplam 30 siklus devam edildi.

- Son döngüyü takiben 72 °C 10 dakika uzama siklusu gerçekleştirildi.

### **3.3.1.3. Agaroz Jel Elektrophorez ve Jel Görüntüleme**

Agaroz jelini hazırlamak için 1X Tris/Borate/EDTA (TBE, Gibco, İngiltere) tamponu kullanıldı. Jelde elde edilen DNA'ların konacağı kuyucukların oluşması için elektrophorez tarakları jel kabına, tabanda 1 mm boşluk olacak biçimde standart olarak yerleştirildi. %1,5 agaroz olacak şekilde ısıtılan solüsyona soğuduktan sonra etidyum bromid eklenerek jel kabına döküldü. Katı hale gelmesi için oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletildi. Donan jelin içindeki taraklar, dikkatlice çıkartıldı ve jel kullanıma hazır hale getirildi. PCR işleminden sonra elde edilen ampliconlar 5µl alınarak elektrophorez tankında (Wealtec Elite 300 Plus, Amerika) bulunan 1X TBE (Invitrogen, Amerika) tamponu içindeki agaroz jele (Invitrogen, Amerika) 6X DNA yükleme tamponu (Termo Fisher, Amerika) ile uygun miktarda karıştırılarak yüklendi. DNA standardı olarak 100-2000bp marker (Invitrogen, ABD) kullanıldı. 140 Volt'da 60 dakikalık elektrophorez işleminden sonra jel görüntüleme cihazına (Quantum Vilber Lourmat, Fransa) yerleştirilerek bilgisayar programı (Vilber Lourmat Software, Fransa) vasıtasıyla dökümente edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışma kapsamında analiz edilen 200 Enterokok izolatının dağılımı, 90 (%45)'i *E. faecalis*, 66 (%33)'si VR *E. faecium*, 36 (%18)'si *E. faecium*, 5 (%2,5)'i *E. gallinarum*, 2 (%1)'si *E. avium* ve 1 (0,5)'i de VR *E. faecalis* şeklindedir (Tablo 4). Bu enterokokların izole edildiği materyale göre detaylı dağılımı Tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Analiz edilen enterokokların tür, direnç durumu ve izole edildiği materyale göre dağılımı.

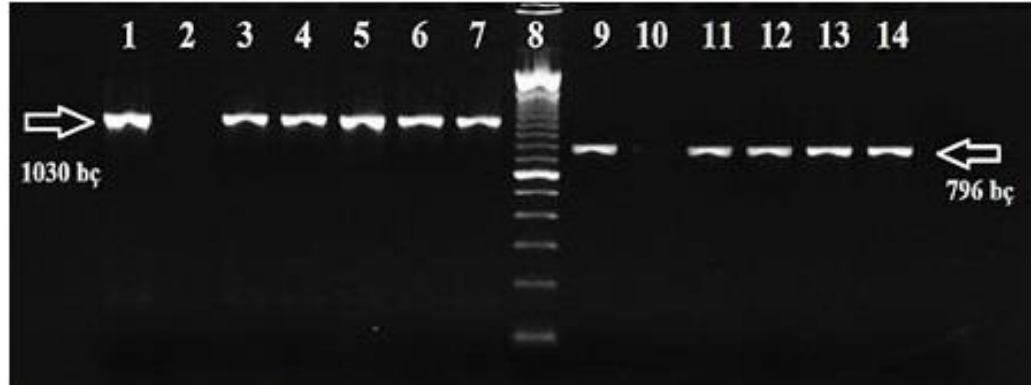
Materyal	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	VR <i>E. faecium</i>	VR <i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. avium</i>	Toplam
İdrar	52	18	15	-	2	1	88
Yara	22	4	4	-	-	1	31
Kan	8	7	3	-	1	-	19
Doku	1	2	1	1	-	-	5
Abse	4	2	4	-	-	-	10
ETA	2	-	-	-	-	-	2
Balgam	1	-	-	-	-	-	1
IV Katater	-	1	1	-	-	-	2
Trakeal Kanül	-	1	-	-	-	-	1
BOS	-	-	1	-	-	-	1
Sürveyans	-	1	35	-	2	-	38
Diren	-	-	2	-	-	-	2
<b>Toplam</b>	<b>90</b>	<b>36</b>	<b>66</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>200</b>

Çalışma kapsamında analiz edilen 200 izolat ile yapılan *vanA*, *vanB* ve *vanC* PCR sonuçlarına göre; toplamda 97 (%48,5) adet *vanA*, dört (%2) adet *vanC*, iki (%1) adet *vanA+vanC* direnç genleri pozitif izolat tespit edilmiş olup 97 (%48,5) izolat ise direnç genleri bakımından negatif olarak belirlendi. Vitek-2 tarafından VR *E. faecium* olarak tanımlanmış 66 suşun 61'i (%92,4) *vanA*, ikisi (%3) *vanA+vanC* olarak tespit edilirken, üç (%4,6) izolat negatif olarak belirlendi (Tablo 5). Doksan *E. faecalis* izolatından 19'u (%21,1) *vanA* pozitif olarak tespit edilirken 71 (%78,9) suş ise negatif olarak belirlendi. Otuz altı *E. faecium* suşundan 16 tanesi (%44,4) *vanA* pozitif bulunurken, 20 (%55,6) izolat ise negatif olarak belirlendi. Beş *E. gallinarum* suşundan dördü (%80) *vanC* olarak tespit edilirken bir (%20) suşun ise *vanC* negatif olduğu bulundu. İki *E. avium* suşu analiz edilen tüm direnç genleri

açısından negatif olarak tespit edildi. İzolatlarla yapılan *vanA* ve *vanC* PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez sonrası elde edilen görüntülerden biri Resim 3'te gösterildi.

**Tablo 5.** Enterokok izolatlarının *vanA*, *vanB* ve *vanC* PCR sonuçları

Tür (n)	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i>	<i>vanA+vanC</i>
VR <i>E. faecium</i> (66)	61	0	0	2
VR <i>E. faecalis</i> (1)	1	0	0	0
<i>E. faecium</i> (36)	16	0	0	0
<i>E. faecalis</i> (90)	19	0	0	0
<i>E. gallinarum</i> (5)	0	0	4	0
<i>E. avium</i> (2)	0	0	0	0
(n=200)	<b>97</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>2</b>



**Resim 3.** Bazı izolatlarla yapılan *vanA* ve *vanC* PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez sonrası görüntüsü. 1; *vanA* pozitif, 2; *vanA* negatif kontrol, 3-7 *vanA* pozitif izolatlar, 8; Marker (Invitrogen 100 bp DNA ladder, ABD), 9; *vanC* pozitif, 10; *vanC* negatif kontrol, 11-14 *vanC* pozitif izolatlar.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antibiyotiklerin çoğuna kazanılmış direnç gösteren enterokoklar, ayrıca sahip oldukları intrinsik direnç sebebiyle de tedavi seçeneklerini sınırlamaktadırlar. Glikopeptid grubu içinde yer alan özellikle vankomisin ve teikoplanin antibiyotiklerine transpozonlar, plazmidler ve genetik mutasyonlar yoluyla direnç geliştirebilirler. Başka bakteri türlerine direnç özelliği aktarabilen ve barsak florasında herhangi bir belirti göstermeden kalıcı kolonizasyon yaratarak endojen kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen enterokokların, hastanelerde yaratmış oldukları enfeksiyonların önemi her geçen gün artmaktadır. Avrupa’da 1988 yılında, ABD’de 1989 yılında ve ülkemizde de 1998 yılında bildirimleri (Uttley ve ark, 1988; Leclercq ve ark, 1988; Sahm ve ark, 1989; Vural ve ark, 1999) başlayan VRE enfeksiyonları, hastane kaynaklı ve toplum kökenli enfeksiyonlarda dikkati çekmektedir. Bu nedenlerle, enterokoklardaki direncin belirlenmesi, mekanizması ve bu türlerin kaynağının ortaya konulmasına yönelik çalışmalar önem arz etmektedir.

Çeşitli Avrupa ülkeleri arasında VRE epidemiyolojik verilerindeki büyük değişkenliğin varlığına EARSS raporunda dikkat çekilmiştir (Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe, 2015). VRE oranları bakımından en fazla direnç oranı %45,1 ile invaziv *E. faecium*’lar arasında İrlanda’da bildirilmiştir. İrlanda, Yunanistan ve Portekiz’de bu oran % 20’den fazla bulunurken, % 2’den az bildirilen ülkeler de mevcuttur (Finlandiya, Hollanda). Direnç oranındaki önemli artışlar; Bulgaristan, Hırvatistan, Danimarka, Macaristan, İrlanda, İtalya, Slovakya ve İngiltere’de gözlenirken, Belçika, Fransa ve Almanya’da dirençli olan izolatların oranında azalma eğilimi olduğu bildirilmiştir (Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe, 2015). ABD’de 2006-2007 yılları arasında Amerika Ulusal Sağlık Hizmeti Güvenlik Ağı (NHSN)’na göre enterokokların %33’ü vankomisine dirençli iken, Kanada’da VRE yaygınlığının <%10’dan çok daha düşük olduğu görülmüştür (Hidron ve ark, 2008; Zhanel ve ark, 2008). Bazı metodolojik sınırlarla birlikte, farklı çalışmalar VRE’nin yol açtığı enfeksiyonların daha ciddi olduğunu ve VSE’lerin neden olduğu hastalıklara kıyasla daha yüksek mortalite ve ekonomik yük ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Orsi ve Ciorba, 2013; Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe, 2015).

Türkiye’de bu alanda yapılan çalışmalar incelendiğinde nozokomiyal enfeksiyonlara en sık neden olan türün *E. faecalis* (%85-89) olduğu ve *E. faecium*’un

ise enfeksiyonların yaklaşık %10-15'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Sümerkan, 2002). Ülkemizde ilk vankomisin dirençli enterokok enfeksiyonu olgusu, Vural ve ark. (1999) tarafından bildirilmiştir. Adana'da 1999-2000 yılları arasında yapılan bir çalışmada 28 (%3,5) vankomisine dirençli izolat arasında 8 *E. faecalis*, 15 *E. faecium*, 1 *E. avium* ve 4 *E. gallinarum* tespit edilmiştir (Kibar ve ark, 2004). Başustaoğlu ve ark. (2001) kan dolaşımı enfeksiyonu olan bir akut miyelositik lösemi hastasından VR *E. faecium* izole etmiş ve Çolak ve ark. (2002) üçüncü basamak bir hastanede ilk VRE salgınına 2002 yılında bildirmiştir. Daha sonra ülkemizde VRE olgularının bildiri hızla artmıştır (Çoban ve ark, 2005; Kılıç ve ark, 2009; Güdücüoğlu ve ark, 2009; Altoparlak ve ark, 2011). Balıkesir'de yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitelerinde yatan toplam 200 hastadan alınan rektal sürüntü örneklerinden 10 enterokok suşu izole edilmiş ve toplam 5 hastanın (%2.5) VRE ile kolonize olduğu saptanmıştır (Yıldırım, 2015).

Enterokoklarda var olan vankomisin direnci, altın standart olan kültür yöntemleri ve otomatize tanımlama yöntemleri dışında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile de belirlenebilmektedir (Çekin ve ark, 2013; Çakırlar ve ark, 2014; Devrim ve ark, 2015). VRE taramasına yönelik kültürel yöntemler genotipik metodlara göre daha fazla iş gücü, maliyet ve biyogüvenlik riski oluşturmaktadır. Bu yöntemin kullanılmasındaki avantaj ise; özellikle düşük düzeyde vankomisin direnci taşıyan enterokok suşlarındaki (*VanB* veya *VanC*) direncin belirlenmesi olarak düşünülmektedir.

Dünyada ve ülkemizde VanA tipi dirençlilik, VRE türleri arasında bildirilen en yaygın enterokokal dirençlilik tipidir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada enterokoklarda *van* genotipleri PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Yüz elli sekiz VRE izolatının 146'sında (%92) *vanA* PCR pozitifliği elde edilirken, *E. faecalis*'e ait tüm (%100) izolatların *vanA*-pozitif olduğu belirlenmiştir (Kuriyama ve ark, 2003). Çek Cumhuriyeti'nde yapılan 2002 - 2003 yılları arasında VRE yaygınlığının araştırıldığı bir çalışmada, VRE fenotipi gösteren enterokoklarda PCR ile *vanA*, *van B* ve *vanC* genleri belirlenmiştir. Bu çalışmada PCR ile *vanA*-pozitif bulunan *E. faecium*'ların (%61,3), hastane kökenli VRE oldukları belirtilmiştir (Kolar ve ark. 2006). Kanada'da CNISP VRE gözetim protokolüne uygun olarak toplanan enterokoklarda yapılan bir çalışmada *vanA*, *vanB* ve *vanC* genleri PCR ile tespit edilip, izolatların %90,1'inde *vanA* pozitifliği belirlenmiştir (McCracken, 2013). Ayrıca bu çalışmada *vanA* geninin *E. faecium*'da yaygınlaşmasının Kanada ve Avrupa çalışmalarında

gözlemlendiği belirtilmiştir. Yunanistan'da 2002 ve 2007 yılları arasında gerçekleştirilen bir çalışmada vankomisine dirençli 7 *E. faecalis* ve 60 *E. faecium* izolatu tespit edilmiş ve 67 VRE'nin 53'ünde (% 79.1) PCR ile belirlenen *vanA* genotipi kaydedilmiştir (Protonotariou ve ark, 2010). Kanada'daki bir çalışmada tümü VRE olan *E. faecium*'ların %90'mının *vanA* tipi direnç genini içermekte olduğu bildirilmiştir (Simner ve ark, 2015).

İstanbul Üniversitesi'nde 2007 yılında yayınlanan bir çalışmada (Aktaş ve ark, 2007), 11 olguda izole edilmiş 13 VRE izolatu fenotipik ve genotipik olarak araştırılmıştır. *vanA*, *vanB* ve *vanC* genlerini belirlemek için multiplks PCR ve aralarındaki klonal ilişkiyi araştırmak için RAPD-PCR (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polimorphic DNA) yapıldığı belirtilmiştir. Fenotipik olarak *vanA* düşünülen tüm *E. faecium*'larda (%100) *vanA* geni amplifiye edilmiştir. Alaca Coşkun ve ark. (2012) çalışmalarında 38 VRE izolatu arasında *E. faecium* ve VanA fenotipi olarak belirlenen 30 (%78,9) suşun hepsinde (%100) de *vanA* geni amplifiye edilmiştir. Çelik ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmada multiplks PCR yöntemi kullanarak, *E. faecium* direnç oranlarını *E. faecalis*'e göre anlamlı derecede yüksek olduğunu belirterek, 30 VRE izolatının 29'unda (%96,66) *vanA* PCR pozitifliği bildirmiştir. Saba Çopur ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, 116 izolatın 93'ü (%80,17) VRE (83'ü (%84,25) *E. faecium*, 4'ü (%4,3) *E. faecalis*) ve 23'ü (%18,83) ise VSE [19'u (%82,61) *E. faecalis*, 4'ü (%17,39) *E. faecium*] olarak bildirilmiştir. VRE olarak tanımlanan tüm izolatlar PCR ile *vanA* pozitif olarak belirtilmiştir. Kırdar ve ark. (2010) yayınladıkları bir çalışmada, 12 VR *E. faecium* izolatına *in vitro* antibiyotik duyarlılık testi yaparak elde ettikleri yüksek düzey glikopeptid direnç sonuçlarının, PCR ile tüm VR *E. faecium*'larda (%100) VanA genini saptadıklarını belirtmişlerdir.

Mevcut çalışmada analiz edilen toplam 200 adet enterokok izolatının 99'unda (%49,5) *vanA* PCR pozitif bulunurken fenotipik olarak VRE olduğu bilinen 72 (%36) izolatın [66 (%91,6) *E. faecium*, 1 (%1,4) *E. faecalis*, 5 (%7) *E. gallinarum*] 64'ünde (%88.8) *vanA* geni amplifiye edilmiştir. Bunlar arasında VR *E faecium*'ların 63'ü (%95,45) de *vanA* pozitif olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar VRE türleri arasında en yaygın direnç tipi olan *vanA* tipinin çalışmanın yapıldığı hastanede baskın olduğunu göstermiştir. Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalarda, *vanA* pozitiflik oranı VRE arasında büyük bir değişkenlik (%61,3-100) göstermekte (Kolar ve ark, 2006; Kırdar ve ark, 2010) olup, bu çalışmada ise %88.8 olarak belirlenmiştir. Bu

farklılığın nedeninin çalışmaların yapıldığı lokasyon, etkenin izole edildiği materyal, izolatların saklama koşulları ve kullanılan yöntemdeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

VanB tipi direncin indüklenebilen ve kazanılmış bir direnç oluşturabilme özelliği, enterokoklar için oldukça önemli olup, *vanB* varlığının araştırılması VRE epidemiyolojisini daha iyi anlamaya katkı sunmaktadır (Graham ve ark, 2008). VanB suşlarında orta düzeydeki vankomisin direnci, direnç fenotipinin değerlendirilmesinde ve ilgili genotipin belirlenmesinde kullanılan tanı yöntemlerinin yetersizliğine yol açmaktadır. Dünyada VRE'ler içinde *vanB* pozitifliği araştırılan çalışmalarda Kuriyama ve ark. (2003) İngiltere'de 158 izolatin 12'sinde (%8), Kanada'da VRE izolatların %9.9'unda (McCracken, 2013) ve Yunanistan'dan yapılan bir çalışmada 7 VR *E. faecalis* ve 60 VR *E. faecium* izolatının arasında 14'ünde (% 20.9) *vanB* genotipi tespit edilmiştir (Protonotariou ve ark, 2010). VanB tipi dirençli enterokok enfeksiyonları son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. VRE açısından düşük prevalanslı bir ülke olan Fransa'da 2001 ve 2008 yılları arasında, yapılan bir çalışmada 731 *E. faecium* izolatu arasında 199 (%27,22) *vanB* tipi VRE bildirilmiştir (Bourdon ve ark, 2011). İsveç'te 2007 yılında yaşanan bir salgın sırasında izole edilen 738 VR *E. faecium* izolatının 634'ünün (%85,9) *vanB* tipi olduğu gösterilmiştir (Söderblom ve ark, 2010). Almanya'da 2009'dan 2011'e kadar 20'den fazla üniversite hastanesinde *vanB* tipi *E. faecium* kökenli önemli salgınlar bildirilmiştir (Werner ve ark, 2012). Ayrıca yine bu çalışmada 2008-2009 yılları arasında 600 neonatal yoğun bakım hastasından 80 (%13,3) VRE tanımlanmış ve 71 (%87,65) VR *E. faecium* izolatının 67'sinde (%94,37) *vanB* tipi VRE tespit edilmiştir. Kanada'da yapılan 2007-2013 yılları arasında, 1927 enterokok izolatının dahil edildiği bir çalışmada 80 (%4,2) izolat VR *E. faecium* olarak tanımlanmış ve çalışma boyunca *vanB* prevalansının 2007 yılında %37,5 iken 2013 yılında %0'a kadar düşmüş olduğu gösterilmiştir (Simner ve ark, 2015).

Ülkemizde VanB tipi direnç ilk Alaca Coşkun ve ark. (2012) tarafından bildirilmiş olup, incelenen 38 VRE izolat arasında VanB fenotipi gözlemlenen sekiz (%21) suşun beşinde (%67,5) *vanB* direnç geni saptanmıştır. PFGE ile yaptıkları değerlendirme sonucunda suşların tamamının aynı grupta buldukları gösterilmiştir. Gözaydın ve ark. (2013) çalışmalarında 135 perianal sürüntü örneğinin 43'ünde (%31,85) *Enterococcus* spp. tanımlanmış ve dört (%2,9) izolatta *vanB* direnç geni tespit etmiştir. Buna rağmen, Çelik ve ark. (2014) 30 VRE izolatının hiç birinde (%0)

*vanB* PCR pozitifliği belirlememiştir. Yapılan çalışmalarda VRE'ler arasında *vanB* gen pozitifliği hiç belirlenemeyen (%0) izolatlardan %94,37 oranına kadar önemli değişkenlik göstermektedir (Werner ve ark, 2012; Çelik ve ark, 2014). Bu çalışmada ise analiz edilen enterokokların hiç birinde (%0) *vanB* geni amplifiye edilememiş olup bu çalışmada ve önceki bildirimlerdeki *vanB* pozitiflik oranındaki bu büyük farklılığın, çalışılan suşların izole edildiği materyaldeki, suşların saklama koşullarındaki, çalışma öncesi etkenin dondurma-çözme ve kültür vasatı pasaj durumundaki ve kullanılan amplifikasyon yöntemlerindeki farklılıklardan kaynaklanması muhtemeldir.

VanC tipi dirençli enterokoklar seyrek olarak izole edilmekte olup bu özelliği kodlayan gen kromozomal yerleşimlidir. *vanC* pozitifliği belirlenen VRE'lerin ciddi invazif enfeksiyonlara neden olabileceği bildirilmiştir (Toye ve ark, 1997). VanC tipi direnç geni taşıyan enterokoklar, diğer VRE'ler (*vanA* ve *vanB* içeren) kadar ciddi klinik enfeksiyonlara neden olabileceği ve vankomisin bu vakalarda yetersiz ampirik kullanımı; terapötik başarısızlığa, hastanede yatış süresinin uzamasına ve tıbbi bakım maliyetlerinde artışa sebebiyet verebilmektedir (Dombrádi ve ark, 2012). Patel ve ark. (2000) çalışmalarında toplam 37 klinik izolatın 7'sinde (%18,92) *vanC* PCR pozitif *E. gallinarum* bildirmiştir. Kolar ve ark. (2006) çalışmasında *vanC* PCR pozitif (%42,6) *E. gallinarum*'ların toplumsal kökenli VRE'ler oldukları belirtilmiştir. Macaristan'da 2004'ten 2009'a kadar gelen klinik örneklerin tanımlaması yapılarak, 7,271 enterokok izole edilmiş ve bu izolatların 16'sının (%0,2) VRE tarama plağında üretildiği bildirilmiştir. Tanımlanan 14 (%87,5) *E. gallinarum* izolatına yapılan multipleks PCR sonrası tamamında (%100) *vanC* pozitif olarak tespit edilmiştir (Dombrádi ve ark, 2012). İspanya'da 2009 yılında *vanC* PCR pozitif 14 (%63,63) *E. gallinarum*'un sağlıklı kişilerden toplanan 157 klinik örnek arasından izole edilmiştir (López ve ark, 2013). Fransa'da gerçekleştirilen çalışmada toplanan 488 örnekten zenginleştirme tekniği kullanılarak izole edilen tüm dirençli suşların multipleks PCR analizi sonucunda 6 (%1,2) *E. gallinarum*'un tamamında (%100) *vanC* pozitifliği bildirilmiştir (Surcouf ve ark, 2011). Türkiye'den araştırmacıların da katıldığı 2000 yılında yapılan bir çalışmada, 4,208 enterokok izolatının 71'i (%1,69) *vanC* pozitif olarak gözlemlenmiştir. VanC VRE prevalansına bakıldığında Letonya (%14,3) ve Türkiye (%11,7) en yüksek değerlere sahip olduğu belgelenmiştir (Schouten ve ark, 2000). Ülkemizde Aktaş ve arkadaşlarının 2000-2001 yılları arasında yaptığı bir çalışmada, 5 (%100) *E. gallinarum* izolatında VanC



tipi direnç saptanmıştır (Aktaş ve ark, 2002). Konya’da yapılan bir çalışmada direnç mekanizmasının tespiti için PCR ile direnç genleri araştırılmış ancak *vanC* direnç geninin tespit edilemediği bildirilmiştir (Arslan ve ark, 2013). Kılıç ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmada, *vanC* direnç genini saptayamadıklarını bildirmiştir. Enterokoklarda *vanC* pozitif bulma oranı büyük bir değişkenlik (%11,7–100) gösterirken (Schouten ve ark, 2000; Aktaş ve ark, 2002), ülkemizde *vanC* pozitiflik bildirimleri 2000 yılında bir bölümü ülkemizde yapılan çalışma haricinde sınırlıdır. Bu çalışmada *vanC* direnç geninin amplifikasyonu hedeflenmiş olup fenotipik otomatize sistem ile identifikasyonu yapılmış, 5 (%2,5) *E. gallinarum* izolatının 4’ünde (%80) ve 66 (%33) *VRE faecium* izolatının 2’sinde (%3,03) *vanC* PCR pozitiflik belirlenmiştir. Bu çalışmada ve diğer bildirimlerdeki farklı enterokok türünde değişen oranda *vanC* pozitifliği belirlenmesinin, daha önce de ifade edildiği gibi, etkenlerin izole edildikleri materyal, coğrafi durum ve yöntemsel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

VSE nedenli enterokokal enfeksiyonların ciddiyeti bazen VRE kökenlilere göre az, bazen de eşit olarak düşünülmüş ve VSE izolatlarının daha fazla virulans faktörü içerdiği bilinmektedir (Saba Çopur ve ark, 2016). Ayrıca, vankomisin ilişkili direnç geni içeren VSE’lerin, bu genleri aktarabilme ve popülasyon dinamiği içinde dirençli fenotipler oluşturmada rol almaları açısından dikkatle takibi önem arz etmektedir. Kore’de 2003 ile 2006 yılları arasında yapılan bir çalışmada, 531 klinik *E. faecium* izolatının ikisi (%0,37) VSE olmak üzere 43’ünde (%8,1) *vanA* pozitifliği bulunmuştur (Cha ve ark, 2013). Kore’de yapılan başka bir çalışmada 2004 ve 2008 yılları arasında hastanelerden toplanan 244 rektal örnekten elde edilen 18 (%7,4) VS *E. faecium* izolatının hepsinde *vanA* direnç geni tespit edilmiştir (Jung ve ark, 2014). Ayrıca yine bu çalışmada, *vanA* pozitif VS *E. faecium*’ların %22,2’si glikopeptid antibiyotiklerine maruz kaldıktan sonra vankomisine dirençli *E. faecium*’a dönüştüğü belirtilmiştir. Yıllara göre *vanA* pozitif VSE izolatı oranı ise; 2004’te 64 izolattan 3’ünü (%4,7), 2005’de 64 izolattan 4’ünü (%6,3), 2007’de 62 izolatın 4’ünü (%6,5) ve 2008’de 54 izolatın 7’sini (%13) içermektedir (Jung ve ark, 2014). Szakacs ve ark (2014); VRE taramalarında kültürel yöntemler ile nükleik asit amplifikasyon yöntemlerini kombine ederek 2009-2011 yılları arasında yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri 52 *vanA* PCR pozitif VS *E. faecium* izolatının genetik karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Kanada’da yapılan bu çalışmada analiz edilen 44 (%15) suşun toplam 285 hastadan izole edildiği bildirilmiştir. Kore’de Choi ve ark. (2011)’nin

vankomisine ve teikoplanine karşı yüksek direnç gösteren karakteristik üç *E. faecium* suşu ile yaptığı çalışmada, üçüncü suş MİK uygulaması sonucunda hem vankomisine hem de teikoplanine duyarlı bulunmuştur. Dupleks PCR kullanarak üç suşta *vanA* geni varlığını tespit etmişlerdir. Bu suşlardan bir (%33,3) tanesinin, vankomisin ve teikoplanin duyarlı olmasına rağmen *vanA* geni taşıdığını göstermişlerdir. Fenotip ve genotip temeline göre üçüncü suş, *vanA* pozitif vankomisin duyarlı *E. faecium* (*vanA*-VSE) olarak sınıflandırılmıştır. ABD’de Vitek-2 otomatize identifikasyon cihazının, bir hastadan izole edilen vankomisin dirençli bir alt popülasyonu kaçırdığı düşüncesiyle yola çıkarak, dört hastada vankomisine dirençli enterokok ve VSE’lerin neden olduğu bakteriyemiler belirlenmiştir. Yapılan detaylı analizler sonucu dört VRE izolatının tamamı ve 4 VSE izolatının 2’si (%50), *vanA* pozitif olarak tespit edilmiştir (Cárdenas ve ark. 2014). Kanada’da VSE *faecium* kolonizasyonu bilinen bir hastaya yapılan PCR sonrasında *vanA* pozitifliği bildirilmiş olup (Coburn ve ark, 2014) bu çalışmada 13 hastanede bulunan VSE *faecium* kolonizasyonu ya da enfeksiyonu bilinen 95 hastada *vanA* PCR pozitifliği bildirilmiştir.

Ülkemizde Uludağ Altun ve ark. (2014)’nın çalışmasında, tanımlamayı geleneksel yöntemle ve otomatik identifikasyonu Vitek-2 sistemi (BioMérieux, Fransa) ile yaptıkları ve VSE olarak tanımlanan iki suşun PCR ile *vanB* pozitif olarak saptandığı bildirilmiştir. Mevcut çalışmada 200 enterokok izolatının tanımlaması Vitek-2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistem ile gerçekleştirilmiştir. Vankomisine duyarlı enterokok olarak belirlenen, 36 (%18) *E. faecium* ve 90 (%45) *E. faecalis* izolatından yapılan PCR çalışmasında sırasıyla 16 (%44,4) ve 19 (%21,1) izolat *vanA* pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu oran Dünya’da ve ülkemizde yapılan çalışmalara göre oldukça yüksek bir düzeyde olup VSE’lerin dikkate alınması gerekliliğini düşündürmektedir.

Vankomisin direnç genleri içeren enterokokların, duyarlı veya dirençli sonuçlandırılmasında rutin kültür ve otomatize sistemlerin bazı limitleri olduğu düşünülmektedir. Bazı seçici besiyerlerinin (Brilliance agar) ve moleküler yöntemlerin sonucu destekleyici olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir. Direnç genleri içeren VSE’lerin VRE olarak yorumlandığı bildirilerin varlığı düşünüldüğünde mevcut çalışmada VSE olarak yorumlanan 35 izolatın (%27.7) direnç geni içermesi oldukça önemli olup mevcut yöntemlere direnç genleri belirleme tekniklerinin eklenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, VSE nedenli bir bakteriyemi olgusunun bildirilmiş olması (Downing ve ark, 2015), konvansiyonel yöntemler ve

otomatize sistemler ile ortaya konulan dirençlilik/duyarlılık durumunun, direnç genlerinin de belirlenerek desteklenmesi gerekliliğini düşündürmektedir.

Fenotipik olarak VRE belirlendiği halde, PCR ile direnç genlerinden herhangi birisinin amplifiye edilemediği izolatların varlığı bilinmektedir. Kanada'da gerçekleştirilen çalışmada VRE pozitifliği belirlenen bir izolatta ve Kore'deki bir çalışmada fenotipik olarak VRE olan 46 izolatın 13'ünde (%28,26) direnç genleri bakımından PCR negatifliğine rastlamıştır (Drews ve ark, 2006; Seo ve ark, 2011). Ülkemizde İzmir'de yapılan bir çalışmada PCR uygulanan sekiz VRE'nin yedisinde (%87,5) *vanA* direnç geni tespit ettikleri bildirilmiştir (Atalay ve ark, 2012). Bu çalışmada otomatize identifikasyon sistemi ile VRE olarak değerlendirilen 72 enterokok izolatının dördünde (%5,55) PCR ile direnç genlerinden herhangi birisi saptanmamıştır. Bu durumun özellikle primer bağlama dizisi içerisindeki bazı muhtemel mutasyonlardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Kromozomal direnç geni *vanC* haricinde, diğer direnç genlerinin (*vanA* ve *vanB*) plazmid veya transpozonlar vasıtasıyla transfer edilebilme yeteneği ile çoklu direnç genine sahip enterokokların *in vivo* ya da *in vitro* olarak temas halinde olabileceği diğer enterokok türleri arasında yayılma nedeni olabilir. Bu nedenle çoklu direnç genine sahip etkenler bu direnci aktarabilme yeteneğinin yüksekliği bakımından ilgi odağıdır. Arjantin ve Brezilya'daki iki çalışmada *vanA+vanC* genlerini birlikte taşıyan *E. gallinarum* izolatları tanımlanmıştır (Togneri ve ark, 2003; Neves ve ark, 2009). Hindistan'da 2013 yılında yapılan bir çalışmada da *E. gallinarum* suşundan *vanA+vanC* direnç genleri izole edildiği bildirilmiştir (Praharaaj ve ark, 2013). Kanada'da 2015 yılında yayınlanmış bir çalışmada vankomisine ve teikoplanine yüksek dirençli *E. gallinarum* suşundan *vanC* direnç genine ek olarak *vanA+vanB* direnç genlerinin varlığı da bildirilmiştir (Eshaghi ve ark, 2015). Ülkemizde Gözaydın ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışmada, 135 perianal sürüntü örneğinden 43 (%31,85) *Enterococcus* spp. izolatu elde etmişler ve bir izolatta (%0,7) *vanA+vanB* tipi çoklu gen birlikteliğinin olduğu sonucuna varmışlardır. Başka bir çalışmada ise, 210 perirektal örnekte RT-PCR yöntemi ile 76 (%36,2) tane VRE tespit edilmiş ve bunların dördü (%5,3) *vanA+vanB* olarak bulunmuştur (Uludağ Altun ve ark, 2014). Mevcut çalışmada VRE *faecium* olarak identifiye edilmiş 66 (%33) izolatın 2'sinde (%3,03) *vanA+vanC* çoklu direnç gen birlikteliği tanımlanmış olup bu sonuçlar etkenlerin ilgili direnç genlerini aktarabilme açısından yüksek potansiyele sahip olduklarını düşündürmektedir.

Hastane ve diğer sağlık kuruluşlarında, VRE sürveyansı enterokokal hastalıkların kontrol ve önlenmesinde önemli bir yaklaşımdır. Bununla beraber son yıllarda yapılan çalışmalarda sürveyans örneklerinden izole edilen ve vankomisin direnç geni taşıyan VSE'lere de dikkat çekilmektedir. Kanada'da bulunan iki hastanede 2008-2010 yılları arasında rutin VRE taramaları için toplanan örneklerden (anal sürüntü ve dışkı) yapılan çalışmada, PCR sonucu *vanA* geni bulunmasına rağmen altı izolatin üçünde (%50) vankomisin duyarlılığı gözlenmiş ve sekans analizi sonucu tüm *vanA* pozitif izolatların yabancı tip *vanA* geni taşıdıkları bildirilmiştir (Gagnon ve ark, 2011). Bu çalışmada sürveyans örneklerinden izole edilen suşlar da analiz edilmiş olup sürveyans örnekleri içinde VSE olarak değerlendirilen ve *vanA* PCR pozitif sonuç veren bir izolata rastlanmıştır. VRE sürveyans örneklemelerinde genellikle göz ardı edilen VSE izolatlarının *vanA* geni taşıması direnç geni aktarabilme potansiyeli bakımından önemli olup çalışma sonuçları, hastane kaynaklı enfeksiyonların kontrol ve sürveyansında bu durumun dikkatle değerlendirilip takip edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Direnç genleri belirleme yöntemleri ve buna bağlı olarak maliyetleri büyük değişkenlik göstermektedir. Atalay ve ark. (2012) VRE tespiti için kültür işlemlerinin 3 TL, Vitek-2 otomatize sisteminin 31 TL ve ticari moleküler yöntemin ise 82 TL olduğunu ilgili dönemin değerleriyle hesaplamıştır. Bu çalışmada "in house" olarak gerçekleştirilen PCR yönteminin örnek başına yaklaşık 4 TL maliyetten fazla olmadığı düşünülürse, ticari kitlelere göre büyük ölçekli araştırmalarda ve sürveyans örneklemelerinde maliyet etkin olarak kullanılabilmesi mümkündür.

Bu çalışmada analiz edilen izolatlar, klonal ilişki durumları düşünüldüğünde küçük ölçekli bir sağlık birimini ve bir yıl gibi kısa bir zaman periyodunu kapsamaktadır. Hastane, yerleşik olan aynı etkenin birden fazla kez izole edilerek araştırma kapsamı içinde bulunması muhtemeldir. Bu nedenlerle, enterokoklarda direnç genleri özelliklerini popülasyon dinamiği ile ilişkilendirerek, daha iyi anlamak için uzun periyotlu ve izolatların genotipleri belirlenerek, filogenetik yakınlıklarının ortaya konulduğu ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Enterokokların hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlardaki önemi özellikle vankomisin olmak üzere antibiyotiklere direnç kazanma sıklığı hızla artmaktadır. Bu nedenle, izolatlarda direnç genlerinin belirlenmesi, enterokokal enfeksiyonların kontrol ve korunma yöntemlerine katkı sunmaktadır. Enterokok izolatlarında *vanA*, *vanB* ve *vanC* genlerinin PCR ile belirlendiği bu çalışma kapsamında analiz edilen

200 enterokok izolatının 99'unda (%49,5) *vanA* ve altısında (%3) *vanC* PCR pozitif bulunurken *vanB* geni amplifiye edilmemiştir. İki izolatta (%1) ise *vanA+vanC* çoklu direnç gen birlikteliği tanımlanmıştır. Farklı enterokok türünde hem VRE hem de VSE suşlarında belirlenen yüksek düzeyde direnç geni varlığı, bu etkenlerde başta *vanA*, *vanB* ve *vanC* olmak üzere direnç ilişkili genlerin dikkatle izlenmesinin etkin kontrol ve önleme yöntemleri için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışma, enterokokların direnç özelliklerini ve epidemiyolojisini daha iyi anlamaya ve ilgili genlerin belirlenmesinin, tanısal desteğinin önemini daha iyi kavramaya katkı sunması beklenmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

- Akan ÖA. Enterokok Türlerinin Mikrobiyolojisi. İçinde: Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Ünal S, Vahapoğlu H (Editörler). Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2004; s.5-9.
- Akçimen B. Hastane infeksiyonların izole edilen vankomisin dirençli enterokokların pulsed field jel elektroforez yöntemiyle genotip tayini. 2010, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 116 sayfa, Adana, (Prof. Dr. Fatih Köksal).
- Aktaş G, Derbentli Ş. Vankomisine dirençli enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. Turk J Med Sci. 2009; 23:201-209.
- Aktaş Z, Diyarbakirli P, Bal C, Gürler N, Keser M, Somer A, Salman N. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşlarının fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi. Mikrobiyol Bul. 2007; 41:347-356.
- Aktaş Z. Enterokoklarda glikopeptid direncinin PCR yöntemiyle araştırılması. 2002, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 99 sayfa, İstanbul, (Prof. Dr. Çiğdem Bal).
- Alaca Coşkun F, Mumcuoğlu İ, Aksu N, Karahan ZC, Us E, Tekeli FA. Bir devlet hastanesinde vankomisine dirençli enterokok suşlarının fenotipik ve genotipik olarak değerlendirilmesi: İlk *vanB*-pozitif *Enterococcus faecium* izolatların. Mikrobiyol Bul. 2012; 46:276-282.
- Alp Ş, Çetinkaya ŞY. Vankomisine dirençli enterokokların epidemiyolojisi ve kontrolü. Hacettepe Tıp Dergisi. 2008; 39:89-95.
- Altoparlak U, Koca O, Ozkurt Z, Akcay MN. Incidence and risk factors of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization in burn unit patients. Burns. 2011; 37:49-53.
- Anderson RCGR, Higgins HM Jr, Pettinga CD. Symposium: How a drug is born. Cincinnati J Med. 1961; 42:49-60.
- Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2014. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm. 2015:p.65-67.
- Appelbaum PC, Bozdoğan B. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin Lab Med. 2004; 24:381-402.
- Arslan U, Demir E, Oryaşın E, Türk Dağı H, Tuncer I, Fındık D, Bozdoğan B. MLST types of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from blood cultures. Mikrobiyol Bul. 2013; 47:432-441.
- Arthur M, and Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in Enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37:1593-1571.

- Arthur M, Depardieu F, Snaith HA, Reynolds PE, Courvalin P. Contribution of VanY D,D-carboxypeptidase to glycopeptide resistance *Enterococcus faecalis* by hydrolysis of peptidoglycan precursors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38:1899-903.
- Atalay S, Ece G, Samlıoğlu P, Maraş G, Kse I, Kse S. Evaluation of vancomycin-resistant *Enterococcus* cases at a tertiary level hospital in Izmir, Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2012; 46:553-559.
- Bakır M, Bova JL, Newell KA, Millis JM, Buell JF, Arnow PM. Epidemiology and clinical consequences of vancomycin-resistant enterococci in liver transplant patients. *Transplantation.* 2001; 72:1032-1037.
- Barie PS, Christou NV, Dellinger EP, Rout WR, Stone HH ve Waymack JP. Pathogenicity of the *Enterococcus* in surgical infections. *Ann Surg.* 1990; 212:155-159.
- Başustaoğlu A, Aydoğan H, Beşirbellioğlu B, Alaca R, zyurt M. GATA'da izole edilen ikinci glikopeptid dirençli *Enterococcus faecium*. XXIX. Türk Mikrobiyoloji kongresi 8-13 Ekim 2000, Antalya; Program ve zet kitabı: s.14-06.
- Başustaoğlu A, Aydoğan H, Beyan C, Yalçın A and nal S. First glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolate from blood culture in Ankara, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7:160-161.
- Başustaoğlu A, Aydoğan H. Enterokoklar. Ed: Uzun . İnfeksiyon Hastalıkları Serisi. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2002; 5:s.45-60.
- Başustaoğlu A. Enterokoklarda Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları ve Direnç Sorunu. Ed: Ulusoy S, Usluer G, nal S. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara, 2004: s.141-158.
- Bentley RW, Leigh JA, Collins MD. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol.* 1991; 41:487-494.
- Berzeg D. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi infeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji kliniği çeşitli klinik materyallerden izole edilen enterokok suşlarında antibiyotik direnci, yüksek zey aminoglikozid direnci ve e-test ile vankomisin MİK değerlerinin değerlendirilmesi. 2005, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 95 sayfa, İstanbul, (Dr. zcan Nazlıcan).
- Biavasco F, Paladini C, Vignaroli C, Foglia G, Manso E, Varaldo PE. Recovery from a single blood culture of two *Enterococcus gallinarum* isolates carrying both vanC-1 and vanA cluster genes and differing in glycopeptide susceptibility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20:309-314.

- Bibler MR, Fame P, Hagler DN. Clinical evaluation of efficacy, pharmacokinetics, and safety of teicoplanin for serious Gram positive infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31:207-212.
- Bilgehan H. “Streptokoklar” Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 9. Basım. Şafak Matbaacılık, 1995: s.248-286.
- Billström H. Molecular epidemiology of clinical *E.faecium*. 2008, Division of Clinical Microbiology Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institute, PhD Thesis, 61 page, Stockholm, (Bodil Lund, DDS, PhD).
- Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant Enterococci: Why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis*. 2001; 1:314-325.
- Bourdon N, Fines-Guyon M, Thiolet JM, Maugat S, Coignard B, Leclercq R, Cattoir V. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66:713-721.
- Boyce J, Opal S, Chow J, Zervos M, Potter-Bynoe G, Sherman C, Romulo RL, Fortna S, Medeiros AA. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable *VanB* class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol*. 1994; 32:1148-1153.
- Bozdoğan B, and Leclercq R. Plasmid-mediated coresistance to streptogramins and vancomycin in *Enterococcus faecium* HM103. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43:2097-2098.
- Brown JH. The Use of Blood Agar for The Study of Streptococci. Monograph 9. The Rockefeller Institute for Medical Research, New York, N.Y. 1919:p.10-49-73.
- Camargo IL, Barth AL, Pilger K, Seligman BG, Machado AR, Darini AL. *Enterococcus gallinarum* carrying the *vanA* gene cluster: first report in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37:1669-1671.
- 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.
- Cárdenas AM, Andreacchio KA and Edelstein PH. Prevalence and detection of mixed-population enterococcal bacteremia, department of pathology and laboratory medicine. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:2604-2608.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin in United Nations, Morbidity and Mortality Weekly Report. 2002; 51:565-567.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in The United States, The U.S. Department of Health and Human Services 2013; 114:67-68.



- Cha JO, Yoo JI, Kim HK, Kim HS, Yoo JS, Lee YS, Jung YH. Diversity of Tn 1546 in vanA-positive *Enterococcus faecium* clinical isolates with VanA, VanB, and VanD phenotypes and susceptibility to vancomycin. *J Appl Microbiol*. 2013; 115:969-976.
- Chenoweth C, Schaberg D. The epidemiology of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990; 9:80-89.
- Choi HJ, Nam D, Peck KR, Song JH, Shin D, Ko KS. Loss of vancomycin resistance not completely dependent on the Tn1546 element in *Enterococcus faecium* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 69:105-110.
- Chou YY, Lin TY, Lin JC, Wang NC, Peng MY, Chang FY. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008; 41:124-129.
- Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, Tenover FC. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37:2311-2317.
- Clewell DB. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*. 1993; 73:9-12.
- Coburn B, Low DE, Patel SN, Poutanen SM, Shahinas D, Eshaghi A, Willey BM, McGeer A. Vancomycin-variable *Enterococcus faecium*: in vivo emergence of vancomycin resistance in a vancomycin-susceptible isolate. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:1766-7.
- Çakırlar FK, Samastı M, Barış I, Kavaklı H, Karakullukçu A, Sirekbasan S, Bağdatlı Y. The epidemiological and molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci isolated from rectal swab samples of hospitalized patients in Turkey. *Clin Lab*. 2014; 60:1807-1812.
- Çekin Y, Erman Daloğlu A, Oğünç D, Özhak Baysan B, Dağlar D, İnan D, Mutlu D, Ongüt G, Çolak D. Evaluation of vancomycin resistance 3 multiplexed PCR assay for detection of vancomycin-resistant enterococci from rectal swabs. *Ann Lab Med*. 2013; 33:326-330.
- Çelebi S. Vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) ve tedavisi. *J Curr Pediatr*. 2008; 6:182-186.
- Çelik S, Çakırlar FK, Torun MM. Presence of vancomycin, aminoglycosides, and erythromycin resistance genes in enterococci isolated from clinical samples in Turkey. *Clin Lab*. 2014; 60:1801-1806.
- Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev*. 2000; 13:686-707.
- Çoban AY, Darka O, Taşdelen Fisgin N, Cihan CC, Bilgin K, Akgüneş A, Güven T, Dokuzoğuz B, Birinci A, Durupınar B. The resazurin microplate method for rapid detection of vancomycin resistance in enterococci. *J Chemother*. 2005; 17:361-366.

- Çolak D, Naas T, Gunseren F, Fortineau N, Ogunc D, Gultekin M, Nordmann P. First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50:397-401.
- Çöleri, A. Türkiye Kökenli Klinik *Enterococcus*'ların Antibiyotik Dirençliliği. 2002, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 93 sayfa, Ankara, (Prof. Dr. Cumhur Çökmüş).
- Çöleri A, Çökmüş C. Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2008; 65:87-96
- Del Vecchio VG, Petroziello JM, Gress MJ, McCleskey FK, Melcher GP, Crouch HK, Lupski JR. Molecular genotyping of methicilin-resistan *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive sequence PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:2141-2144.
- Derbentli Ş. Nozokomiyal enterokok infeksiyonları. *Galenos.* 1998; 23: 14-17.
- Devriese LA, Pot B, Kersters K, Lauwers S, Haesebrouck F. Acidification of methyl-alpha-D-glucopyranoside: A useful test to differentiate *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium* species group and from *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:2607-2608.
- Devrim F, Gülfidan G, Gözmen S, Demirağ B, Oymak Y, Yaman Y, Oruç Y, Yaşar N, Apa H, Bayram N, Vergin C, Devrim İ. Comparison of the BD GeneOhm VanR assay and a chromogenic agar-based culture method in screening for vancomycin-resistant enterococci in rectal specimens of pediatric hematology-oncology patients. Department of Pediatrics. *Turk J Pediatr.* 2015; 57:161-166.
- Dombrádi Z, Dobay O, Nagy K, Kozak A, Dombrádi V, Szabo J. Prevalence of vanC vancomycin-resistant enterococci in the teaching hospitals of the University of Debrecen. *Microb Drug Resist.* 2012; 18:47-51.
- 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.
- Downing MA, Xiong J, Eshaghi A, McGeer A, Patel SN, Johnstone J. Vancomycin-Variable Enterococcal Bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:3951-3953.
- Drews SJ, Johnson G, Gharabaghi F, Roscoe M, Matlow A, Tellier R, Richardson SE. A 24-hour screening protocol for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:1578-1580.
- Dunny GM, Leonard BAB, and Heberg PJ. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: Interbacterial and host-parasite chemical communication. *J Bacteriol.* 1995; 177:871-876.



- Fontana R, Grossata A, Rossi L, Cheng YR, Satta G. Transition from resistance to hypersusceptibility to  $\beta$ -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.
- Ford M, Perry JD, Gould FK. Use of cephalixin-aztreonam arabinose agar for selective isolation of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:2999-3001.
- Gagnon S, Lévesque S, Lefebvre B, Bourgault AM, Labbé AC, Roger M. VanA-containing *Enterococcus faecium* susceptible to vancomycin and teicoplanin because of major nucleotide deletion in Tn 1546. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66:2758-2762.
- Garcia-Garrote, F, Cercenado E, Bouza E. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:2108-2111.
- Gazin M, Lammens C, Goossens H, Malhotra-Kumar S; MOSAR WP2 Study Team. Evaluation of GeneOhm *vanR* and Xpert *vanA/vanB* molecular assays for the rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31:273-276.
- Gemmell CG. Glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: Is it a real threat? *J Infect Chemother.* 2004; 10:69-75.
- Glew R. Vancomycin. In: *Infectious Diseases.* Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (Eds.). Pennsylv Vania: W.B. Saunders Company; 1992:p.231-239.
- Gözaydın A, Köse S, Ece G, Ersan G, Gönüllü M. Detection of Vancomycin Resistant Enterococci from Rectal Swab Samples by Becton-Dickinson GeneOhm *vanR* assay and Culture at ICU of a Tertiary Care Center in Turkey. *Pak J Med Sci.* 2013; 29:682-686.
- Graham M, Ballard SA, Grabsch EA, Johnson PDR, and Grayson ML. High Rates of Fecal Carriage of Nonenterococcal *vanB* in both Children and Adult. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:1195-1197.
- Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, Hamilton B, Venter D. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:2918-29131.
- Guardabassi L and Dalsgaard A. Occurrence, structure, and mobility of TN1546-like elements in environmental isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70:984-990.
- Güdücüoğlu H, Aktaş E, Beğendik Cömert F, Aygül K, Ozlü N, Baykal S, Berktaş M, Ceylan A. First isolation and detection of multiple clones of vancomycin-resistant enterococci in the pediatric unit of Van Yuzuncu Yil University Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2009; 43:535-543.

- Handwerger S, Perlman DC, Altarac D, and McAuliffe V. Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of Enterococci. *Clinical Infect Dis.* 1992; 14:655-661.
- Handwerger S, Raucher B, Altarac D, Monka J, Marchione S, Singh KV, Murray BE, Wolff J, Walters B. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Clin Infect Dis.* 1993; 16:750-755.
- Hanrahan J, Hoyen C, and Rice LB. Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:1349-1351.
- Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK; National Healthcare Safety Network Team. Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Center for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29:996-1011.
- Hijazi N, Elmanama AA, Al-Hindi A. Vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and non-hospitalized individuals in Gaza City. *J Public Health.* 2009; 17:243-249.
- Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1995; 16:105-113.
- Huckabee CM1, Huskins WC, Murray PR. Predicting clearance of colonization with vancomycin-resistant *Enterococci* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by use of weekly surveillance cultures. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:1229-1230.
- Johson AP. The pathogenicity of enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 1994; 33:1083-1089.
- Jones D. Composition and differentiation of the genus *Streptococcus*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 1978; 7:1-49.
- Jung YH, Lee YS, Lee SY, Yoo JS, Yoo JI, Kim HS, Kim O, Yu JY. Structure and transfer of the vanA cluster in vanA-positive, vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium*, and its revertant mutant. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 80:148-150.
- Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol.* 1995; 45:406-408.
- Kılıç A, Bedir O, Tunç T, Beşirbellioğlu B, Eyigün CP, Başustaoğlu AC. Bir Eğitim Hastanesinin Çocuk Kliniğinde vanA Genotip *Enterococcus faecium* Salgını. *Mikrobiyol Bul.* 2009; 43:365-372.

- Kırdar S, Sener AG, Arslan U, Yurtsever SG. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from haematological malignancy patients in a research hospital in Turkey. J Med Microbiol. 2010; 59:660-664.
- Kirst HA, Thompson DG, Nicas TI. Historical yearly usage of vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42:1303-1304.
- Kibar F, Yaman A, Dündar İH. İdrar Örneklerinden İzole Edilen Bakteriler ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34:162-170.
- Klare I, Heier H, Claus H, Reissbrodt R, Witte W. vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. FEMS Microbiol Lett. 1995; 125:165-171.
- Klare I, Konstabel C, Badstübner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. Int J Food Microbiol. 2003; 88:269-90.
- Kohner PC, Patel R, Uhl JR, Garin KM, Hopkins MK, Wegener LT, Cockerill FR 3rd. Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk diffusion, and automated Vitek methods for testing susceptibilities of *Enterococcus* spp. to vancomycin. J Clin Microbiol. 1997; 35:3258-63.
- Kolar M, Pantucek R, Vagnerova I, Sauer P, Kesselova M, Cekanova L, Koukalova D, Doskar J, Ruzickova V. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Czech Republic. New Microbiol. 2006; 29:121-125.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Procop G, Woods G. The Gram-Positive Cocci Part II: Streptococci, Enterococci, and The “Streptococci-Like” Bacteria. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Koneman EW (Ed.). 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006:p. 672-745.
- Korten V. Enterokoklar. İçinde: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2.baskı. 2002:1497-1506.
- Kuriyama T, Williams DW, Patel M, Lewis MA, Jenkins LE, Hill DW, Hosein IK. Molecular characterization of clinical and environmental isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from a teaching hospital in Wales. J Med Microbiol. 2003; 52:821-827.
- Kurtgöz Ö. Klinik örneklerden izole edilen enterokok türlerinde vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozid direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. 2013, Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 110 sayfa, Hatay, (Doç. Dr. Burçin Özer).
- Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J exp med. 1933; 57:571-595.

- Lavery A, Rossney AS, Morrison D, Power A, and Keane CT. Incidence and detection of multi-drug-resistant in Dublin hospitals. *J. Med. Microbiol.* 1997; 46:150-156.
- Livornese LL Jr, Dias S, Samel C, Romanowski B, Taylor S, May P, Pitsakis P, Woods G, Kaye D, Levison ME. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann Intern Med.* 1992; 117:112-116.
- Leblebicioğlu H, Esen S. Hospital-acquired urinary tract infection in Turkey: A nationwide multicenter point prevalence study. *J Hosp Infect* 2003; 53:207-210.
- Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. D-Ala-d-Ser *VanN*-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:4606-12.
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N. (Eds.). Boston, United States; 2014:p.18.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988; 319:157-161.
- Lefort A, Mainandi JL, Tod M, Lortholory O. Antienterococcal antibiotics. *Med Clin North Ame.* 2000; 6:1471-1495.
- Levine DP, Vancomycin: A history. *Clin Infect Dis.* 2006; 42:5-12.
- Lewis CM, Zervos MJ. Clinical manifestations of enterococcal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990; 9:111-117.
- Ligozzi M, Lo Cascio G, and Fontana R. *VanA* Gene cluster in a vancomycin-resistant clinical isolate of *Bacillus circulans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42:2055-2059.
- López M, Tenorio C, Torres C. Study of vancomycin resistance in faecal enterococci from healthy humans and dogs in Spain a decade after the avoparcin ban in Europe. *Zoonoses Public Health.* 2013; 60:160-167.
- Martone WJ. Spread of vancomycin-resistant enterococci: Why did it happen in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998; 19:539-545.
- Mazuski JE. Vancomycin-resistant *Enterococcus*: risk factors, surveillance, infections, and treatment. *Surg Infect.* 2008; 9:567-571.
- McCracken M, Wong A, Mitchell R, Gravel D, Conly J, Embil J, Johnston L, Matlow A, Ormiston D, Simor AE, Smith S, Du T, Hizon R, Mulvey MR; Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1999-2009. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68:1505-1509.

- McDonald LC, Kuehnert MJ, Tenover FC, Jarvis WR. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. *Emerg Infect. Dis.* 1997; 3:311-317.
- Miele A, Bandera M, Goldstein BP. Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in enterococci and to study gene organization in *vanA* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39:1772-1778.
- Moaddab S, Töreci K. Enterokok Suşlarında Tür Tayini, Vankomisin ve Diğer Bazı Antibiyotiklere Direnç Aranması. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 2000; 30:77-84.
- Moellering RC Jr. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992; 14:1173-1178.
- Moellering RC Jr. *Enterococcus* Species. In: Principles and Practise of Infectious Diseases, Mandell GL (Ed.). 5th Ed. New York: Churcill Livingstone, United States; 2000;p.2147-2156.
- Moellering RC Jr. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds.). 6th ed. New York: Churchill Livingstone, United States; 2005;p.2414-2415.
- Murray BE, Mederski-Samoraj B. Transferable beta-lactamase a new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest* 1983; 72:1168-1171.
- Murray BE, Singh KV, Ross RP, Don Heath J, Dunny GM, Weinstock MG. Generation of Restriction Map of *Enterococcus faecalis* OG1 and Investigation of Growth requirements of Growth requirements and regions encoding biosynthetic function. *J Bacteriol.* 1993; 175:5216-5223.
- Murray BE. The life and times *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3:45-65.
- Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *Am J Med.* 1997; 101: 284-293.
- Murray BE. Vancomycine Resistant Enterococcal Infections. *N. Eng. J. Med.* 2000; 342:710-721.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from October 1986-April 1998, issued June 1998. *Am J Infect Control.* 1998; 26:522-33.
- Neves FP, Ribeiro RL, Duarte RS, Teixeira LM, Merquior VL. Emergence of the *vanA* genotype among *Enterococcus gallinarum* isolates colonising the intestinal tract of patients in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33:211-215.
- Orsi GB, Ciorba V. Vancomycin resistant enterococci healthcare associated infections. *Ann Ig.* 2013; 25:485-92.
- 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.



- Öztürk R, Midilli K, Ergin S. Cerrahpaşa tıp fakültesi kliniklerinde yatan hastaların klinik materyallerinde izole edilen stafilokokların antimikrobik maddelere duyarlılıkları. *Ankem Derg.* 1995; 9:105.
- Papadimitriou-Olivgeris M, Filippidou S, Kolonitsiou F, Drougka E, Koutsileou K, Fligou F, Dodou V, Sarrou S, Marangos M, Vantarakis A, Anastassiou ED, Petinaki E, Spiliopoulou I. Pitfalls in the identification of *Enterococcus* species and the detection of vanA and vanB genes. *Lett Appl Microbiol.* 2016; 63:189-195.
- Patel R, Rouse MS, Piper KE, Steckelberg JM. In vitro activity of GAR-936 against vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000; 38:177-179.
- Perencevich EN, Fisman DN, Lipsitch M, Harris AD, Morris JG Jr, Smith DL. Projected benefits of active surveillance for vancomycin-resistant enterococci in intensive care units. *Clin Infect Dis.* 2004; 38:1108-15.
- Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Claverie-Martín FA. PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 42:273-277.
- Praharaj I, Sujatha S, Parija SC. Phenotypic & genotypic characterization of vancomycin resistant *Enterococcus* isolates from clinical specimens. *Indian J Med Res.* 2013; 13:549-556.
- Protonotariou E, Dimitroulia E, Pournaras S, Pitiriga V, Sofianou D, Tsakris A. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. *J Hosp Infect.* 2010; 75(3):225-227.
- Rice L, Hutton-Thomas R, Lakticova V, Helfand M, Donskey C. Beta-lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Dis.* 2004; 189:1113-1118.
- Saba Çopur Ş, Şahin F, Göçmen JS. Determination of virulence and multidrug resistance genes with polymerase chain reaction method in vancomycin-sensitive and -resistant enterococci isolated from clinical samples. *Turk J Med Sci.* 2016; 46:877-891.
- Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, Solliday J, Clarke B. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33:1588-1591.
- Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A; European VRE Study Group. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19:816-822.
- Seo JY, Kim PW, Lee JH, Song JH, Peck KR, Chung DR, Kang CI, Ki CS, Lee NY. Evaluation of PCR-based screening for vancomycin-resistant enterococci compared with a chromogenic agar-based culture method. *J Med Microbiol.* 2011; 60:945-9.

- Sherman JM. The streptococci. *Bacteriol Rev.* 1937; 1:3-97.
- Shlaes DM. Vancomycin-resistant bacteria. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1992; 13:193-194.
- Simjee S. and Gill MJ. Gene transfer, gentamicin resistance and Enterococci. *J Hospital Infect.* 1997; 249-259.
- Simner PJ, Adam H, Baxter M, McCracken M, Golding G, Karlowsky JA, Nichol K, Lagacé-Wiens P, Gilmour MW. Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA), Hoban DJ, Zhanel GG. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Canadian hospitals (CANWARD study, 2007 to 2013). *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59:4315-4317.
- 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.
- Söderblom T, Aspevall O, Erntell M, Hedin G, Heimer D, Hokeberg I, Kidd-Ljunggren K, Melhus A, Olsson-Liljequist B, Sjogren I, Smedjegard J, Struwe J, Sylvan S, Tegmark-Wisell K, Thore M. Alarming spread of vancomycin resistant enterococci in Sweden since 2007. *Euro Surveill.* 2010; 15:2-3.
- Somma S, Gastaldo L, and Corti A. Teicoplanin, a new antibiotic from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984, 26:917-923.
- Spelman DW. 2: Hospital-acquired infections. *Med J Aust.* 2002; 176:286-291.
- Sun M, Wang Y, Chen Z, Zhu X, Tian L, Sun Z. The first report of the *vanC1* gene in *Enterococcus faecium* isolated from a human clinical specimen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014; 109:712-715.
- Surcouf C, Fabre M, Enouf V, Cadé S, Soler C, Mac Nab C, Samson T, Foissaud V. Glycopeptide-resistant enterococci carriage: Are actual isolation and identification techniques sufficient? *Pathol Biol (Paris).* 2011; 59:146-150.
- Sümerkan B. Vankomisine dirençli enterokoklar. İçinde: Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları Samsun. Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Leblebicioğlu H (Editörler). Samsun İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Araştırmaları Derneği. 2002: s.329-334.
- Swenson JM, Clark NC, Sahm DF, Ferraro MJ, Doern G, Hindler J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Reller LB, Weinstein MP. Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:3019-3021.
- Szakacs TA, Kalan L, McConnell MJ, Eshaghi A, Shahinas D, McGeer A, Wright GD, Low DE, Patel SN. Outbreak of vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* containing the wild-type *vanA* gene. *J Clin Microbiol.* 2014; 52:1682-1686.

- Şardan YÇ. Enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. Uzun Ö (Ed.). İnfeksiyon Hastalıkları Serisi 2002. Ankara. 2002: s.61-67.
- Şardan YÇ. Enterokoklarda direnç sorunu. İçinde: Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Şardan YÇ. (Editör). Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2004: s.10-16.
- Taşova Y, İnal AS. Enterokok infeksiyonlarında klinik. İçinde: Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Şardan YÇ. (Editör). Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2004: s.17-22.
- Teixeira LM, Carvalho MS, Shewmaker PL, Facklam RR. Enterococcus. In: Manual of clinical microbiology. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (Eds.). 10th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, United States; 2011:p.350-365.
- Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. Curr Opin Infect Dis. 2005; 18:300-305.
- Togneri A, Lopardo H, Corso A. Bacteremia caused by *Enterococcus gallinarum* with a high level of glycopeptide resistance: 1st documented cases in Argentina. Rev Argent Microbiol. 2003; 35:96-99.
- Tok ÇN. Enterokoklarda vankomisin direnci. 2006, T.C Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 50 sayfa, İstanbul, (Doç.Dr. Paşa Göktaş).
- Toye B, Shymanski J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K. Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the vanC genotype). J Clin Microbiol. 1997; 35:3166-3170.
- Tremlett CH, Brown DFJ, and Woodford N. Variation in structure and location of *vanA* glycopeptide resistance elements among enterococci from a single patient. J Clin Microbiol. 1999; 37:818-820.
- Trutmann M, Wiedeck H, Ruhnke M. Teicoplanin: 10 years of clinical experience. Infection 1994; 22: 430.
- Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG J, Sulakvelidze A. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol. 2000; 38:4242-4245.
- Uludağ Altun H, Ataman Hatipoğlu C, Bulut C, Eser OK, Demiröz AP, Comparison of GeneXpert® vanA/vanB PCR system and culture methods in the surveillance of vancomycin-resistant enterococci. Mikrobiyol Bul. 2014; 48:538-544.
- Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi 2013 yıllık raporu (UAMDSS). T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye halk sağlığı kurumu başkanlığı, Ankara. 2015: s.39-41.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS): Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi, Cilt II. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı, Mikrobiyoloji

- Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. *Enterococcus faecalis/faecium*: Tanımlanması ve AMD Testleri (Vankomisin direnci, yüksek düzey aminoglikozid direnci), Ankara. 2014: s.1-30.
- Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*; 1988; 1:57-58.
- Vincent S, Knight RG, Green M, Sahm DF, and Shlaes DM. Vancomycin susceptibility and identification of motile enterococci. *J Clin Microbiol*. 1991; 29:2335-2337.
- Vural T, Şekercioğlu AS, Ögünç D. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *ANKEM Derg*. 1999; 13:1-4.
- Wallace M, Idfield EC III. Prospective evaluation of Red Man Syndrome. *J Infect Dis*. 1994; 169:700-701.
- Wegener HC. Historical yearly usage of glycopeptides for animals and humans: The American European paradox revisited. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42:3049.
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE, Tenover FC. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. 2003; 302:1569-1571.
- Werner G, Coque TM, Hemmerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Jonshon A, Klare I, Kristinsson KG, Leclencq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance*. 2008; 13:1-11.
- Werner G, Strommenger B, Witte W. Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Microbiol*. 2008; 3:547-562.
- Werner G, Klare I, Fleige C, Geringer U, Witte W, Just HM and Ziegler R. Vancomycin-resistant *vanB*-type *Enterococcus faecium* isolates expressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012; 1:21.
- Winn W, Stephan A, Janda W, Koneman EW, Procop G (Eds.). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Baltimore Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins. 2006:p.40-43.
- Yıldırım DS. Fekal ve Klinik Örneklerden Soyutlanan Enterokok Kökenlerinin Antibiyotik Duyarlılıklarının Saptanması. 2015, Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 75 sayfa, Balıkesir, (Prof. Dr. Gülhan Vardar Ünlü).
- Zerr DM, Garrison MM, Allpress AL, Heath J, Christakis DA. Infection control policies and hospital-associated infection among surgical patient: variability and associations in a multicenter pediatric setting. *Pediatrics*. 2005; 115:387-392.

Zhanel GG, DeCorby M, Laing N, Weshnoweski B, Vashisht R, Tailor F, Nichol KA, Wierzbowski A, Baudry PJ, Karlowsky JA, Lagacé-Wiens P, Walkty A, McCracken M, Mulvey MR, Johnson J; Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA), Hoban DJ. Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:1430-1437.

Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-Resistant Enterococci: Colonization, Infection, Detection, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006; 81: 529-536.



## 7. EKLER

### Ek. 1. ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

#### CİLTLİ TEZ YAZIM KONTROL LİSTESİ

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Onay sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Teşekkür sayfası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Türkçe özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İngilizce özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekiller dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tablolar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Yöntem ve Gereç	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Bulgular	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tartışma	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sonuç ve Öneriler	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kaynaklar	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tez planı	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tarih: ... / ... / 20... Öğrenci Bio. Mümin SARGIN  İmza	Tarih: ... / ... / 20... Danışman Prof. Dr. Ahmet ÜNVER  İmza	

## Ek. 2. Etik Kurul Onay Formu



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Tıp Fakültesi Dekanlığı  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 18920478-202.03.02-E.6384  
Konu : Dilekçeniz Hk.

17.01.2017

Sayın Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

İlgi : 07.12.2016 tarih ve 21321718-202.03.02-E.137859 sayılı dilekçeniz.

İlgili dilekçenize istinaden tez danışmanlığı değişikliği önerisi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nda görüşülmüştür.

İlgili dilekçeniz, Anabilim Dalı Kurul Kararı ve YÖK başkanlığının yazısına istinaden "Enterokok İzolatlarında VanA, VanB ve VanC Genlerinin Belirlenmesi" başlıklı Yüksek Lisans tez araştırmasında (2014-17 nolu Etik Kurul toplantısının 10. kararı) sorumlu araştırmacı olmanız Klinik Araştırmalar Etik Kurulunda görüşülmüş ve önerilen isim değişikliği kurulumuzca uygun görülmüştür.

Bilgilerinize rica ederim.

 e-imzalıdır

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR  
Başkan

Not: 5070 sayılı elektronik imza kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Bilgi için: Faize OTURAN  
Sekreter

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Mümin	<b>Soyadı</b>	SARGIN
<b>Doğum Yeri</b>	Kırcaali	<b>Doğum Tarihi</b>	11.11.1989
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kimlik No</b>	29005360162
<b>E-mail</b>	muminsargin@gmail.com	<b>Tel</b>	02862635950/4009

### Eğitim

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Yüksek Lisans</b>	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	...
<b>Lisans</b>	Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2012

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Yıl</b>
Biyolog	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2015-2017

### Katıldığı Kongreler/Sempozyum ve Bildiriler

Erişkin Aşı Sempozyumu/İzmir/2014
Ekmud Çanakkale Enfeksiyon Akademisi/Çanakkale/2014
Trakya Üniversiteler Birliği Lisansüstü öğrenci Kongresi/Çanakkale/2016
Tekin S.Z., Vural A., Kiraz A. Sargin M. Unver A., “Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerde indirekt emaglutinasyon yöntemi ile kistik Ekinokokkozis seropozitiflik oranlarının değerlendirilmesi”, 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İSTANBUL, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, cilt.11,ss.2-2