



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HASTANE İNFEKSİYONLARINDAN İZOLE EDİLEN
VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOKLARIN
PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZ
YÖNTEMİYLE GENOTİP TAYİNİ**

DR. BERİL AKÇİMEN

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FATİH KÖKSAL**

ADANA-2010



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HASTANE İNFEKSİYONLARINDAN İZOLE EDİLEN
VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOKLARIN
PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZ
YÖNTEMİYLE GENOTİP TAYİNİ**

DR. BERİL AKÇİMEN

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FATİH KÖKSAL**

Bu çalışma TF2007LTP 30 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

ADANA-2010

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, her konuda desteğini esirgemeyen, bilimsel çalışma disiplini ve azmini örnek aldığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Fatih Köksal'a ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine; çalışmam süresince bana her konuda yardımcı olan Doktora öğrencisi ve Araştırma görevlisi Tülin Gökmen'e ve çalışma arkadaşlarıma, her konudaki destek ve katkılarından dolayı bölüm sekreterimiz Suna Gökmen'e ve tüm anabilim dalı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Beril AKÇİMEN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖZET-ANAHTAR SÖZCÜKLER	ix
ABSTRACT-KEYWORDS	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Mikrobiyolojik özellikler	4
2.2.1. Görünüm ve Boyanma Özellikleri	4
2.2.2. Üreme özellikleri ve fizyolojik karakterleri	5
2.2.3. Hücre duvarı yapısı ve antijenik özellikleri	6
2.2.4. Sınıflama ve İdentifikasyon	7
2.2.5. Genom Özellikleri	11
2.2.6. Genetik Bilgi Transferi	12
2.3. Virulans faktörleri	13
2.3.1. Hemolizin / Sitolizin	14
2.3.2. Jelatinaz	15
2.3.3. Enterokokal surface protein	16
2.3.4. Agregasyon faktör	16
2.3.5. MSCRAMM Ace	17
2.3.6. Kapsül, hücre duvarı polisakkaritleri	17
2.3.7. Lipoteikoik asit	18
2.3.8. Süperoksitler	18
2.3.9. Seks feromonları	18
2.3.10. Hyaluronidaz	19
2.3.11. Enterococcus faecalis antijen A (EfaA proteini)	20
2.3.12. AS-48	20
2.3.13. Antibiyotik Direnci	20
2.4. Enterokoklarda antimikrobiyal direnç mekanizmaları	21
2.4.1. İnterensek Direnç	21
2.4.1.1 Beta laktam direnci	21
2.4.1.2 Aminoglikozid direnci	22
2.4.1.3 Diğer antibiyotikler	22
2.4.2. Eksterensek Direnç	22
2.4.2.1 Beta laktam direnci	22
2.4.2.2 Aminoglikozid direnci	23
2.4.2.3 Kloramfenikol direnci	24
2.4.2.4 Tetrasiklin direnci	24
2.4.2.5 Kinolon direnci	24

2.4.2.6	MLS _B direnci	24
2.4.2.7	Oksazolidinon direnci	25
2.4.2.8	Glikopeptit direnci	25
2.4.2.8.1	Fenotipik tanımlama	25
2.4.2.8.2	Genotipik tanımlama	28
2.4.2.8.2.1	VanA Glikopeptit direnci	28
2.4.2.8.2.2	VanB Glikopeptit direnci	30
2.4.2.8.2.3	VanC Glikopeptit direnci	30
2.4.2.8.2.4	VanD Glikopeptit direnci	31
2.4.2.8.2.5	VanE Glikopeptit direnci	31
2.4.2.8.2.6	VanG Glikopeptit direnci	31
2.4.2.8.2.7	Vankomisin Bağımlı Enterokoklar	32
2.5.	Kolonizasyon ve Risk Faktörler	33
2.6.	Enterokok Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	36
2.7.	Enterokokal Enfeksiyonlar	40
2.8.	Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri	42
2.8.1-	Fenotipik tipleme metotları	44
2.8.1.1.	Biyotipleme :	44
2.8.1.2.	SDS-PAGE ile Protein fingerprinting	45
2.8.1.3.	Multi-Lokus Enzim Elektroföresi (MLEE)	46
2.8.1.4.	Antimikrobiyal duyarlılık testleri	46
2.8.1.5-	Serotipleme	47
2.8.2.	Genotipik Tipleme Metotları	48
2.8.2.1.	Restriksiyon Enzim Analizi (REA) Bazlı Yöntemler	48
2.8.2.1.1.	Plasmid DNA profil analizi	49
2.8.2.1.2.	Pulsed Field Gel elektroföresi (PFGE)	49
2.8.2.1.3.	Ribotipleme	50
2.8.2.2.	Nükleik Asit Amplifikasyonu Bazlı (NAAB) Teknikler:	51
2.8.2.2.1.	PCR Bazlı teknikler	51
2.8.2.2.2.	Random Amplified Polimorphic DNA-PCR: RAPD-PCR(AP-PCR)	52
2.8.2.2.3.	Spesifik ve Random Amplifikasyon-PCR: SARA-PCR	53
2.8.2.2.4.	Amplified fragment length polymorphism (AFLP)	53
2.8.2.2.5.	Rep-PCR	53
2.8.2.2.6.	İntergenik rRNA spacer bölgeleri- PCR (ITS-PCR)	54
2.8.2.2.7.	Diğer Amplifikasyon Bazlı yöntemler	54
2.8.2.3.	Dizi Analizi Yöntemleri	55
2.8.2.3.1.	Parsiyel Dizi Analizi	55
2.8.2.3.2.	Multilokus Sequence Tipleme MLST	55
2.9.	Enterokok Enfeksiyonlarının Tedavisi	56
2.10.	Enterokok Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol Önlemleri	58
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	62
3.1.	Tür tayini ve Vankomisin duyarlılıklarının tespiti	62
3.2.	Klonal ilişkinin tespiti	67
3.2.1.	PFGE	67
3.2.1.1.	İzolatların hazırlanması	67
3.2.1.2.	İzolatların agaroz gömülmesi	68
3.2.1.3.	Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması	68
3.2.1.4.	Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması	69
3.2.1.5.	Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi	69

3.2.1.6. Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi	70
3.2.1.7. Elektroforez	71
3.2.1.8. Sonucun gözlenmesi ve analizi	71
3.2.1.9. PFGE yönteminde kullanılan solüsyonlar	72
3.2.2. RAPD	73
3.2.2.1. Kültür plaklarından DNA ekstraksiyonu	73
3.2.2.2. S13 primeri ile amplifikasyon	74
3.2.2.3. Fragmentlerin agaroz gel elektroforezi ile tespiti	74
3.2.2.4. Görüntüleme ve bant profillerinin analizi	75
4. BULGULAR	76
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	102
7. KAYNAKLAR	104
ÖZGEÇMİŞ	116

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo no</u>	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1: Enterokokların sınıflandırılması	8
Tablo 2: Enterococcus cinsi içerisinde yer alan türler	8
Tablo 3: Enterokok türlerinin fenotipik özellikleri	10
Tablo 4: Enterokoklarda direnç fenotiplerinin özellikleri	27
Tablo 5: Grup I'de değerlendirilen VRE lerin kliniklere göre dağılımı	64
Tablo 6: Grup I'de değerlendirilen VRE lerin izole edildikleri klinik materyale dağılımları	64
Tablo.7: Grup II de değerlendirilen VRE izolatlarının kliniklere göre dağılımı	65
Tablo 8: Grup III de değerlendirilen VSE'ların izole edildikleri kliniklere göre dağılımı	66
Tablo 9: Grup III de değerlendirilen VSE'ların izole edildikleri klinik materyale göre dağılımı	66
Tablo 10: Çalışmaya dahil edilen enterokok izolatlarının türlere dağılımı	76
Tablo 11: Enterokok izolatlarının izole edildiği örnek gruplarına dağılımı	77
Tablo12: Enterokok izolatlarının glikopeptit türü antibiyotiklere duyarlılıkları	78

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil no</u>	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1: Enterokokların Gram boyama görüntüleri	5
Şekil 2: <i>E.faecalis</i> hücre duvarındaki polimerlerin şematik görüntüsü	7
Şekil 3: Enterokok türleri identifikasyon şeması	11
Şekil 4: Seks-feromon sistemi transfer mekanizması	19
Şekil 5: VanA operonu	28
Şekil 6: Vankomisin bağımlı enterokok	32
Şekil 7: Avrupa’da VR <i>E.faecium</i> prevalansı, 2007	38
Şekil 8: <i>SmaI</i> restriksiyon enziminin hedef aldığı baz dizisi ve kesim bölgesi.	69
Şekil 9: Hastane infeksiyonuna yol açan VRE izolatlarının PFGE ile elde edilen jel görüntüsü	79
Şekil 10: Hastane infeksiyonuna yol açan VRE izolatlarının PFGE ile elde edilen dendrogramı	79
Şekil 11: Hastane infeksiyonuna yol açan VRE izolatlarının RAPD ile elde edilen jel görüntüsü	80
Şekil 12: Hastane infeksiyonuna yol açan VRE izolatlarının RAPD ile elde edilen dendrogramı	81
Şekil 13: Kolonizasyona yol açan VRE izolatlarının PFGE ile elde edilen jel görüntüsü	82
Şekil 14: Kolonizasyona yol açan VRE izolatlarının PFGE ile elde edilen dendrogramı	82
Şekil 15: Kolonizasyona yol açan izolatların RAPD ile elde edilen jel görüntüsü	83
Şekil 16: Kolonizasyona yol açan izolatların RAPD ile elde edilen dendrogramı	84
Şekil 17: VSE izolatlarının PFGE ile elde edilen jel görüntüsü	85
Şekil 18: VSE izolatlarının PFGE ile elde edilen dendrogramı	85
Şekil 19: VSE izolatlarının RAPD ile elde edilen jel görüntüsü	86
Şekil 20: VSE izolatlarının RAPD ile elde edilen dendrogramı	86
Şekil 21: Enterokok izolatlarının PFGE ile elde edilen dendrogramı	87
Şekil 21’in devamı Enterokok izolatlarının PFGE ile elde edilen dendrogramı	88

KISALTMALAR

AAC(6')-APH(2'') : 6' Asetil transferaz-2'' fosfotransferaz
AF: Agregasyon faktör
AFLP: Amplified Fragment Length Polimorfizm
APACHE : Acute Physiology and Chronic Health Evaluation scoring system
AP-PCR: Arbitrarily Primed PCR
ARDRA: Amplified rDNA Restriction Analysis
ATCC: American Type Culture Collection
BE: Bile-Eskulin
BHIB: Brain-Heart infusion broth
BOS: Beyin omurilik sıvısı
CC17: Clonal Complex 17
CDC: Centers for Disease Control
CNA: Columbia-Kolistin Nalidiksik agar
ÇİD: Çoklu ilaç direnci
DGGE: Denaturing Gradient jel elektroforezi
EARSS: European Antimicrobial Surveillance System
EFA: Enterococcus faecalis antigen A
Eh: oksidasyon redüksiyon potansiyeli
ESP: Enterokokal Surface Protein
FTIR: Fourier Transform Infrared
GİS: Gastro intestinal sistem
GRE: Glikopeptit rezistan enterokok
HICPAC: Hospital Infection Control Practices Advisory Committee
HLAR: High level Aminoglikozid direnci
HLGR: High level gentamisin direnci
HST: Hücre süspansiyon Tamponu
Hyl: Hyaluronidaz
IL: İnterlökin
ILLM: Inductive Learning by logic minimisation System
ITS-PCR: İntergenik rRNA Spacer PCR
LAP: Leucin aminopeptidaz
LTA: Lipoteikoik asit
MBK: Minimum bakterisidal Konsantrasyon
MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MLEE: Multilocus enzyme electrophoresis
MLSB: Makrolid Linkomisin Streptogramin B
MLTS: Multilocus sequence typing
MMP: Matriks Metallo Proteinaz
MNV: Metronidazol Neomisin Vankomisin
MRS: Proton Manyetik Rezonans Spektroskopi
MSCRAMM Ace: microbial surface komponent recognizing adhesive matrix molecule adhesin of kollagen from Enterococci
MYD88: Myeloid Differentiation factor 88
NAA: Nükleik asit amplifikasyon
NAAB: Nükleik Asit Amplifikasyonu Bazlı
NNIS: The National Nosocomial Infection Surveillance System
ORF: Open Reading Frame
PBP5: Penisilin Bağlayan Protein

PCR: polymerase chain reaction
PEA: Phenil ethyl alkol agar
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PGE-2: Prostoglandin E2
PI: Patojenite adası
PMNL: Polimorfonükleer lökosit
PYR:Pyrolydonil b-naftilamid
PYRase: Pyrolidonil arylamidase
RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA
RCR: Rolling circle replicating plasmid
RE:Restriksiyon endonükleaz
REA: Restriksiyon Enzim Analizi
Rep-PCR: Repetitif PCR
RFLP: Restriksiyon fragment Length Polimorfizm
SDS-PAGE: Sodium Dodesil Sülfat poli- akrilamid jel elektroforezi
TBE: Tris- Borik asit EDTA
TIGR: The İnstitute for Genomic Research
TGGE: Temporal temperature gradient gel elektroforezi
TLR: Toll Like Receptor
TMP-SMX: Trimetoprim- Sulfometaksazol
TNF-Alfa: Tumor nekrotizan faktör-alfa
UPGMA: Unweighted pair group mathematical averaging
VDE: Vankomisin bağımlı enterokoklar
VRE: Vankomisin Rezistan Enterokok
VSE: Vankomisin sensitif enterokok
YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

ÖZET

Hastane Enfeksiyonlarından İzole Edilen Vankomisin Rezistan Enterokokların Pulsed Field Gel Elektroforez Tekniği İle Genotip Tayini

Vankomisin rezistan enterokoklar hastane enfeksiyonuna sebep olan patojenler arasında giderek artan sıklıkta izole edilmektedir. Enfeksiyonların yayılımının önlenmesinde ve kontrolünde, intestinal vankomisin rezistan enterokoklar kolonizasyonu olan hastaların erken tespiti ve hastane enfeksiyonu salgını ile ilişkilerinin gösterilmesi önemlidir. Vankomisin rezistan enterokoklar izolatları ile salgın arasındaki ilişkinin gösterilmesinde genotiplendirme yöntemleri ile klonal ilişkinin tespit edilmesi gereklidir. Bu amaçla çok sayıda moleküler bazlı genotiplendirme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemlerden PFGE; hastane kökenli salgınların sürveyansında, salgın izolatlarının ilişkilendirilmesi ve salgın kaynağının tespit edilmesinde, ayırım gücü en yüksek olan ve “altın standart” olarak kabul edilen bir yöntemdir.

Bu çalışmada hastane kökenli enterokok izolatlarının glikopeptit türevi antibiyotik direnç profilleri ve bu izolatların hastane enfeksiyonları ile ilişkilerinin tespitinde Pulsed Field jel Elektroforez ve Randomly Amplified Polymorphic DNA yöntemlerinin uygulanabilirliğini araştırılmıştır. Bu amaçla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına çeşitli servislerden gönderilen; 33 (%41,77)’ü hastane enfeksiyonu tanısına uyan hastalara ait klinik örneklerden, 30 (%37,98)’u kolonizasyonu gösteren örneklerden ve 16 (%20,25)’sında hastane enfeksiyonu dışı enfeksiyon yakınması olan hastalara ait klinik materyalden izole edilen olmak üzere toplam 79 enterokok izolatı değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak; değerlendirilen hastane enfeksiyonu ve kolonizasyonla ilişkili izolatlar arasında vankomisin rezistan *E.faecium*’un hakim olduğunu, bu izolatların yüksek oranda (%93,5-80) teikoplanin direnci geliştirdikleri, hastane enfeksiyonu izolatları ile kolonizasyon izolatları arasında yüksek oranda yakın klonal ilişkinin olduğu görülmüş, Pulsed Field jel Elektroforez yönteminin vankomisin rezistan enterokoklar sürveyansında Randomly Amplified Polymorphic DNA’dan daha yüksek ayırım gücüne sahip ve stabil sonuçlar üreten bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcük: Genotipleme, PFGE, RAPD, VRE

ABSTRACT

The Genotyping of Vancomycine Resistant Enterococci Isolated Nosocomial Infections with Pulsed Field Gel Electrophoresis

Vancomycine resistant Enterococci are isolated in increasing frequency among the pathogens that cause nosocomial infections. Early detection of patients with intestinal Vancomycine resistant Enterococci colonization and the demonstration of their relationship with the hospital infection outbreaks are important in controlling and preventing the spread of these infection. The clonal relationship between Vancomycine resistant Enterococci isolates and the outbreak should be determined with genotyping methods. For this purpose, a large number of molecular-based genotyping methods has been used. Among these methods, Pulsed field gel electrophoresis is considered as the 'gold standard' with the highest discriminatory power in the surveillance of nosocomial outbreaks, and the detection and association of outbreak isolates.

In this study, the glycopeptide resistance profiles of Enterococcus isolates and the applicability of Pulsed field gel electrophoresis and Randomly Amplified Polymorphic DNA methods in determining the relationship of these isolates with nosocomial infections have been investigated.

For this purpose, a total of 79 enterococci isolates were evaluated which were obtained from various clinical specimens sent to the Balcalı Hospital Central Laboratory, The Faculty of Medicine, Çukurova University. Of these isolates, 33 (41,77%) were isolated from clinical specimens in patients with nosocomial infection, 30 (37,98%) from rectal specimens in patients with intestinal colonization and 16 (20,25%) from clinical specimens in patients with non-nosocomial infections.

As a result, Vancomycine resistant *E.faecium* was found to be the dominant isolate among the nosocomial infections and the isolates related to intestinal colonization that were evaluated. It was also found that these isolates developed a high (93,5% and 80% respectively) teicoplanin resistance and that there is a close clonal relationship between nosocomial infection isolates and intestinal colonization isolates. In the Vancomycine resistant Enterococci surveillance, Pulsed field gel electrophoresis method has been found to have a higher discriminatory power and to yield stable results when compared to Randomly Amplified Polymorphic DNA.

Keywords: Molecular typging, PFGE, RAPD, VRE

1.GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıkları insanlığın varoluşundan bu yana bütün toplumları etkileyen en önemli problemlerden biri olmuştur. Enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmalara karşı eski çağlardan beri çok çeşitli organik ve inorganik kimyasallar, tütüsüler ve boyalar kullanılmıştır. Penisilini keşfinden sonra antibiyotik çağı başlamış ve takip eden yıllarda çok sayıda doğal, semisentetik ve sentetik antimikrobiyal özelliğe sahip ajan üretilerek enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Bu antimikrobiyallerle enfeksiyon hastalıklarının çoğu tedavi edilebilmişken; antibiyotiklerin hatalı kullanımı sonucu yeni bulunan her antibiyotiğe karşı kısa sürede direnç gelişmiş ve 1900'lü yılların son çeyreğinde *A.baumannii*, *S.maltophilia*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* ve Enterokoklar gibi hastane florasına hakim olan ve hastane enfeksiyonlarından sık izole edilen bu major patojenlerin klinik izolatları arasında düşük oranda çoklu ilaç direnci (ÇİD) gösteren suşlar ortaya çıkmaya başlamıştır^{1,2,3}. Başlangıçta hastanelerde görülen ÇİD gösteren suşlar daha sonra topluma da yayılmaya başlamış, sonuç olarak; bu yeni suşların sebep olduğu hastane ve/veya toplum kökenli, klasik antibiyotik tedavisine cevap vermeyen, yeni enfeksiyonlar tüm dünyada yüksek morbidite ve mortalitenin sebebi haline gelmiştir^{1,2,3,4,5}.

İntestinal ve vaginal floranın üyesi olan enterokoklar uzun zaman düşük virulanslı patojenler olarak değerlendirilmişlerdir. Hastanelerde yoğun ve hatalı antibiyotik kullanımı sonucu başta beta-laktam ve aminoglikozid grubu olmak üzere glikopeptit türevi antibiyotiklere karşı direnç geliştiren enterokoklar, yatan hastalarda barsak florasını ve anatomik yapılarını bozan diğer kemoterapatiklerin de yardımı ile barsak lümeninden lamina propria'ya transloke olarak genel dolaşıma karışıp endojen kökenli bakteriyemi ve endokardite, bu hastaların kontamine çıkartıları ile temas sonucu da diğer hastalarda ekzojen kökenli hastane enfeksiyonlarına yol açarak morbidite ve mortalitenin en önemli sebebi haline gelmişlerdir^{4,5}. Günümüzde vankomisin ve/veya teikoplanin dirençli enterokoklar (VRE/GRE); genel olarak hastane enfeksiyonlarının

dördüncü, üriner sistem ve cerrahi yara enfeksiyonlarının ikinci, kan dolaşımı enfeksiyonlarının ise üçüncü sıklıkta görülen patojenleridir⁶. VR *E.faecium* suşlarının insidansı ABD’de %20-40, bazı Avrupa ülkelerinde de %10’un üzerindedir. Avrupa’da en yüksek VRE prevalansı(2007) Yunanistan ve Portekiz’de %45 bulunmuştur.^{7,8,143}.

Hastane kökenli VRE enfeksiyonlarının insidansındaki artış trendi, hastanın endojen florasında yer alan antibiyotiklere dirençli VRE’lerin, hastane şartlarında kullanılan dezenfektanlar ile ortamın nem, ısı ve kuruluğu gibi in-vitro şartlarına karşı da direnç geliştirerek, hastanede doğal veya kazanılmış immün sistemleri çeşitli sebeplerle baskılanmış hastalar arasında kolaylıkla yayılmasına bağlanmaktadır⁶. Bu sebeple VRE’lere bağlı hastane enfeksiyonlarının yayılımının önlenmesinde ve kontrolünde, intestinal florasında VRE kolonizasyonu olan yatan hastaların erken tespiti ve hastane enfeksiyonu salgını ile ilişkilerinin gösterilmesi önemlidir.

VRE’lere bağlı hastane enfeksiyonlarında salgın suşları arasındaki ilişkinin tespitinde önceleri biyokimyasal özellikler, antibiyotipleme, westernblotting ve Multilokus enzim elektroforezi(MLEE) gibi fenotipik özelliklere dayalı epidemiyolojik izlem yöntemleri kullanılmıştır. Ancak bu yöntemler, düşük tekrarlanabilirlik ve ayırım güçleri, pahalı ve zaman alıcı yöntemler olmaları gibi dezavantajları sebebi ile yerlerini daha yüksek ayırım gücüne sahip yüksek tekrarlanabilirlik özelliği gösteren moleküler epidemiyolojik izlem yöntemlerine bırakmışlardır. VRE kökenli hastane enfeksiyonlarında, salgın suşları arasındaki ilişkinin tespitinde bu yöntemlerden: Randomly Amplified Polimorfik DNA(RAPD), Multilokus sekans tipleme (MLST) ve Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) gibi genotipe dayalı moleküler epidemiyolojik yöntemler sık kullanılmıştır. Hastane kökenli salgına yol açan bir çok cins mikroorganizmada, izolatlar arası ilişkinin tespiti ve kaynağının gösterilmesinde, ayırım gücü en yüksek olan PFGE yöntemi “altın standart“ olarak kabul edilmektedir^{3,10,11,12}.

Bu çalışmada PFGE ve RAPD yöntemleri kullanılarak, Çukurova Üniversitesi (Ç.Ü.) Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi yoğun bakım üniteleri ile çeşitli servislerde yatan hastalardan izole edilen hastane kökenli enfeksiyona ve kolonizasyona sebep olan VRE’ler ve çeşitli poliklinik ve kliniklerde hastane enfeksiyonu öyküsü olmayan hastalara ait çeşitli klinik materyallerden izole edilen vankomisin duyarlı enterokok (VSE) izolatlarının hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi açısından klonal ilişkilerinin tespiti amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Enterokok cinsine ait mikroorganizmalar ilk olarak streptokoklar içerisinde “fekal orijinli streptokoklar” olarak gruplandırılmıştır. Enterokok terimi, ilk kez Thiercelin(1899) tarafından Fransa’da yayımlanan bir makalede “insan gaitasında kısa zincirler veya çiftler halinde görülen bakterileri” tanımlamak için kullanılmıştır¹³. Aynı yılda William MacCallum ve Thomas Hastings Akut endokarditli bir hastada “*Micrococcus zymogenes*” denilen inatçı ve dirençli bir bakteri tanımlamışlardır¹⁴. Birkaç yıl sonra Alexander Gordon, muhtemelen hayvan gaitası ile havadan kontamine olmuş sıvı besiyerinde fekal streptokok izole ettiğini bildirmiş ve S.Houston lağım suyunda bol miktarda streptokok bulunduğunu bildirmiş ve suların insan gaitası ile kontaminasyonunu göstermede yararlı olabileceğini ileri sürmüştür. *Streptococcus faecalis* tür ismi de ilk olarak F.W.Andrews ve T.J.Horder (1906) tarafından, mannitolü ve laktozu fermente eden ancak raffinozu fermente etmeyen ve sütün kesilmesine yol açan gaita kökenli organizmaları tanımlamak için kullanılmıştır^{13,15}.

Orla-Jensen (1919) bu grupta fermentasyon özellikleri *S.faecalis*’ten farklılık gösteren *Streptococcus faecium* denilen ikinci bir organizma tanımlamışlar¹⁶. M. Sherman ve Helen U. Wing tarafından (1935 ve 1937) *S. faecium*’a benzeyen ancak daha az fermentasyon özelliği gösteren üçüncü bir tür olan *Streptococcus durans* tanımlanmıştır. J.M.Sherman, 1937 ve 1938 yıllarında, 9.6 pH’da, 10-45°C arasındaki sıcaklıklarda ve %6.5 NaCl içeren sıvı besiyerinde üreyebilen ve 60°C’de yarım saat canlılığını sürdürebilen streptokoklar için “Enterococcal grup” terimini kullanmıştır¹⁷. S.S.Nowlan ve R.H.Deibel(1967) bu gruba *S.avium*’u eklemiştir. A.P.Kalina (1970) enterokokal streptokoklar için bir cins oluşturulmasını ve hücresel dizilim ve fenotipik özelliklerine göre *S.faecalis* ve *S.faecium*’un *Enterococcus* olarak isimlendirilmesini önermiştir. Bu öneri fazla dikkate alınmamış ve uzun bir süre Enterokoklar, Lancefield

sınıflamasına göre serolojik olarak Grup D Streptokoklar olarak *Streptococcus* cinsi içerisinde kalmıştır¹³.

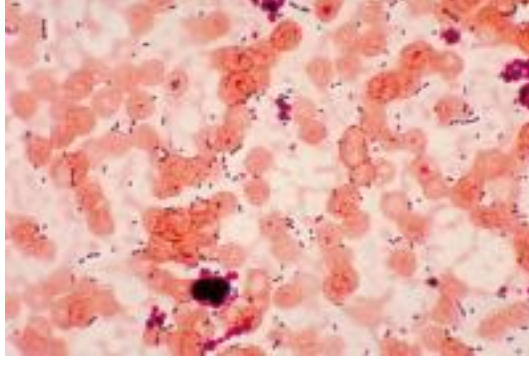
Daha sonra, K.H. Schleifer ve R. Klipper-Baltz (1984) *S.faecalis* ve *S.faecium* türlerinin diğer streptokoklardan farklı olduklarını ileri sürerek bunların *Streptococcus* cinsinden ayrılıp *Enterococcus* adı altında cinsi olarak tanımlanması gerektiğini söylemişlerdir. Daha sonra DNA-DNA reasosiyasyon çalışmaları, 16S rRNA dizi analizi ve total hücre protein profil analizi ile enterokokların yeni bir cins oldukları gösterilmiştir (Tablo 1). Bu yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda enterokok cinsi içerisinde en az 34 tür bulunduğu gösterilmiştir¹⁸ (Tablo 2).

2.2. Mikrobiyolojik Özellikler

Enterokoklar sıcak kanlı hayvanların ve insanların GİS'inde, ayrıca böceklerde, bitkilerde dışkı ile kirlenmiş toprak, su ve yiyeceklerde de bulunur. Bu sebeple içme ve kullanma sularındaki fekal kontaminasyonun gösterilmesi için indikatör mikroorganizma olarak kullanılırlar. İnsan dışkısında *E.faecalis* (10^5 - 10^7 cfu/gr), *E.faecium*'dan (10^4 - 10^5 cfu/gr) daha yaygın bulunur, fakat özellikle hastane ortamında *E.faecium* daha baskındır^{19,25}. Enterokoklar vajina, deri, oral kavite ve dental plaklarda daha az sıklıkta bulunmaktadır. Bunların dışında enterokoklar laktik asit üretmelerinden dolayı peynir yapımında başlatıcı olarak da kullanılır ve peynirlerden ve et ürünleri ve diğer yiyeceklerden izole edilebilirler^{13,18,20}.

2.2.1 Görünüm ve boyanma özellikleri

Enterokoklar 0,5-1 µm çapında, tek tek, diplokoklar veya kısa zincirler şeklinde görülebilen, yuvarlak, oval veya kokobasil şeklindeki bakterilerdir. Katı besiyerinde üretilen bakteriler kok veya kokobasiller şeklinde görülürken, sıvı besiyerlerinde üretilen enterokokların daha uzun zincirler oluşturdukları gözlenir. Anilin boyalarla kolay boyanırlar ve Gram pozitiflerdir. *E.gallinarum* ve *E.casseliflavus* hariç, çoğu hareketsizdir¹³.



Şekil 1: Enterokokların Gram boyama görüntüleri

2.2.2 Üreme özellikleri ve fizyolojik karakterleri

Enterokoklar fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Optimal üreme ısıları 35°C (10-45°C) optimal üreme pH'ları da 7.2 $\pm$ 0.2 dir. Koyun kanlı besiyerinde 24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda, 1-2 mm çapta, streptokoklardan daha büyük, kabarık, gri-beyaz renkli S tipi koloniler oluştururlar. *E.faecalis*'lerin 1/3'ü tavşan, insan ve at kanı içeren agarda β -hemoliz oluşturabilir ancak koyun kanlı agarda hemoliz yapmazlar^{13,21,25}. Ancak bazı *E.durans* türleri bütün kanlı agarlarda β -hemoliz oluştururlar. Diğer türlerin tamamı genellikle α - hemolitik veya nonhemolitikdir. α - hemolitik görünen suşlar gerçekte peroksit üreten nonhemolitik suşlardır. Besiyerindeki yeşil renk α -toksin üretimi ile değil, eritrositlerde peroksin etkisi ile oluşmaktadır. *E.casseliflavus*, *E.gilvus*, *E.mundtii*, *E.pallens* ve *E.sulfureus* kanlı agarda sarı pigment oluşturur. Yüksek ısının yanı sıra yüksek oranda tuz ve safra tuzlarını tolere ederler ve % 6.5 NaCl ile %40 safra tuzu varlığında üremeye devam ederler. Eskulini hidrolize eder, Bile-Esculine(BE) agarda rahatlıkla ürerler. *E.cecorum*, *E.columbae*, *E.pallens* ve *E. saccharolyticus* hariç pek çok enterokok türü, pyrolidonyl arylamidase (PYRase) üreterek pyrolidonyl-b-naftilamide (PYR)'i hidrolize ederler. Bütün suşlarda leucine aminopeptidase (LAPase) aktivitesi görülür ve leucine β -naphthylamide'i hidrolize ederler. Gram negatif bakterileri de içeren karışık örneklerden izole edilmeleri için selektif besiyeri olarak azid içeren safra-eskulin-azid agar veya Enterococose agar, Columbia-Kolistin-Nalidiksik asit agar(CNA) veya fenil etil alkol agar(PEA) kullanılabilir²¹. Selektif besiyerlerinin içerdikleri kimyasal maddelere bağlı olarak koloni rengi değişebilir. Örneğin Safra-Eskulin-Azid agar gibi eskulin içeren agarda koloniler siyah halo ile çevrelenmiş, gri-beyaz koloniler olarak

görülebilen; tetrazolium tuzları içeren agarda kolonilerin ortasında tuğla kırmızısı renk oluşur¹³.

Enterokokların karbon metabolizması, solunum, iyon transportu, pirimidin ve folat yolları, stres cevapları ve reaktif oksijen türleri metabolizmaları dikkat çekicidir. Enterokokların bazal metabolik faaliyetleri için, B1, B6 ve B12 vitaminlerine, nükleik asit bazları ve bir karbon kaynağına ihtiyaçları vardır. *E.faecalis*'in çoğalması için histidin, izolösin, metionin ve triptofan gerekli iken, diğer bazı türler arginin, glutamat, glisin, lösin ve valin'e ihtiyaç duyarlar^{13,23}. Ancak bazı türler de bu aminoasitlere ihtiyaç duyulmaz. Vankomisin bağımlı suşlarda olduğu gibi yoğun antimikrobiyal baskı, metabolik ihtiyaçları etkileyebilir. Bu da farklı enterokokların türlerinin metabolik ihtiyaçlarının suştan suşa bile farklılık gösterdiği anlamına gelmektedir¹³.

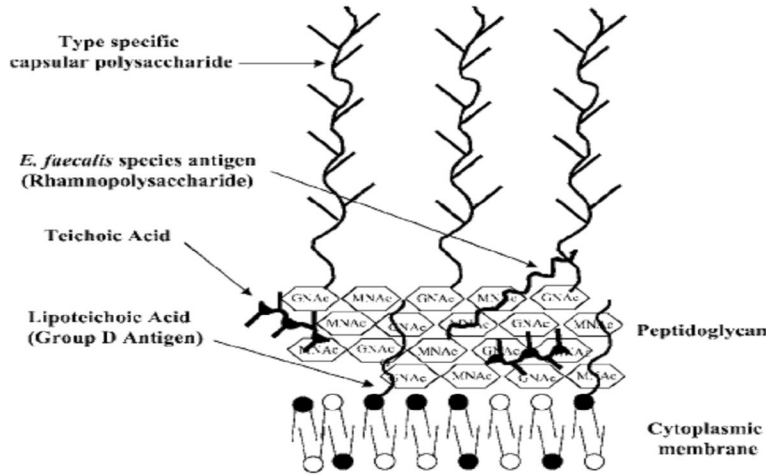
Enterokoklar hem respiratuvar tip hem de fermentatif tipte metabolizmaya sahiptir. Enterokoklar porfirin prekürsörleri sentezleyemez ve bu yüzden sitokrom enzimleri eksprese olmaz ve katalaz negatiftir²². Bazı *E.faecalis*'ler kanlı besiyerinde üretildiğinde sitokrom aktivitesi gösterebilir ve zayıf olarak katalaz pozitifliğine yol açabilir. Ayrıca *E.haemoperoxidus* türlerinde de katalaz pozitifliği bildirilmiştir. Bütün suşlar homofermentiftir, gaz oluşturmazlar ve glukoz fermentasyonun son ürünü laktik asittir²⁴.

2.2.3 Hücre duvarı yapısı ve antijenik özellikleri

Enterokokların hücre duvarının üç bileşeni peptidoglikan, teikoik asit ve polisakkaritlerdir. Hücre duvarının %40'ı peptidoglikandan oluşur, geri kalan kısım ise ramnoz içeren polisakkarit ve ribitol içeren teikoik asittir. Peptidoglikan polimerleri glikan zincirler ve bunlara bağlanmış kısa peptitler L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala'dan oluşur. Komşu peptitler, pentapeptid yan zincirler ile çapraz bağlanırlar. Peptidoglikan dışı yardımcı polimerlerin yapısal bileşimi kesin olarak bilinmemektedir¹³.

Lancefield'in serolojik tiplendirmesinde; streptokokların çoğunun, baskın olan hücre duvarı karbonhidratlarına göre sınıflanmasına karşın, enterokokların yer aldığı "D" grubunda serolojik tiplendirme lipoteikoik asitlerin (LTA) antijenik özelliklerine göre yapılır. Gruba özelliğini veren "D" antijeni, gliserol ünitelerine bağlanmış yüksek oranda glukoz içeren poligliserolfosfatın teikoik asit polimeridir. LTA in lipit kısmı 1-kolibiosyl digliseriddir. Bu glikolipit membranın bir parçası olarak bulunur. Streptokokal grup-D

antijenleri enterokok türleri ile *Streptococcus bovis* kompleks, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Vagococcus* 'larda bulunmaktadır²⁵.



Şekil 2: *E. faecalis* hücre duvarındaki polimerlerin şematik görüntüsü

2.2.4. Sınıflama ve identifikasyon

Schleifer ve Kilpper-Balz (1984) tarafından *Enterococcus* cinsinin kabulünden sonra, streptokoklardan ayrılan enterokoklar içerisinde *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri dahil edilmişken, günümüzde enterococcus cinsinde en az 34 farklı tür tanımlanmıştır. (Tablo 1 ve Tablo 2). Fenotipik farklılıkların yanı sıra 16SrRNA gen dizi analizi yöntemi ile yapılan katalaz negatif Gram pozitif kok cinslerinin filogenetik analizi sonuçlarına göre de, enterokoklar, streptokoklar ve laktokoklar'dan çok *Vagococcus*, *Tetragenococcus* ve *Carnobacterium* cinsleri ile daha yakın ilişkili bulunmuştur. Önceleri, katalaz negatif, Gram pozitif koklardan; BE besiyerinde üreyebilen, PYR ve LAP testi pozitif olan, % 6.5 NaCl'ü ve 45°C'yi tolere eden suşlar enterokok olarak tanımlanmıştır. Enterokoklar bu sınıflandırma ile, kendilerine çok benzerlik gösteren *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Vagococcus*'dan sadece BE reaksiyonu ve % 6.5 NaCl içeren besiyerinde üreme yetenekleri ile ayırt edilebilmiş, ancak sıklıkla hatalı sonuçlar alınarak sınıflandırmada yanlışlıklar yapılmıştır. Diğer taraftan enterokokların %80'inde tespit

edilebilen Grup-D antijeninde taksonomi için yetersiz olduğu görülmüştür. Ayrıca *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve bazı *Vagococcus*’larda grup-D antijeni taşıyabilir. Yine GenProbe tarafından üretilen AccuProbe *Enterococcus* genetik prob, enterokokal rRNA segmentine komplementerdir ve Enterokok tanımlanmasında kullanılabilir. Ancak *Vagococcus*’larda bu prob ile reaksiyon verebilir^{13,25}.

Tablo 1. Enterokokların sınıflandırılması

Kingdom	Bacteria
Division	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Lactobacillales
Family	Enterococcaceae
Genus	<i>Enterococcus</i>

Tablo 2. Enterococcus cinsi içerisinde yer alan türler

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

Geleneksel testler ile tanımlama hızlı değildir. Enterokoklar mannitol, sorbitol ve sorboz içeren besiyerlerinde asit oluşturmalarına ve arginini hidrolize etmelerine göre beş gruba ayrılırlar¹³.

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

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

Grup 3: *E. villorum*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. ratti* ve *E. faecalis* ile *E. faecium*'un mannitol negatif varyantları bu grubu oluşturur. Bu gruptaki türler D antijeni içermez, arginini hidrolize ederler, fakat mannitol, sorboz ve sorbitol içeren sıvı besiyerlerinin hiçbirisinde asit oluşturmazlar.

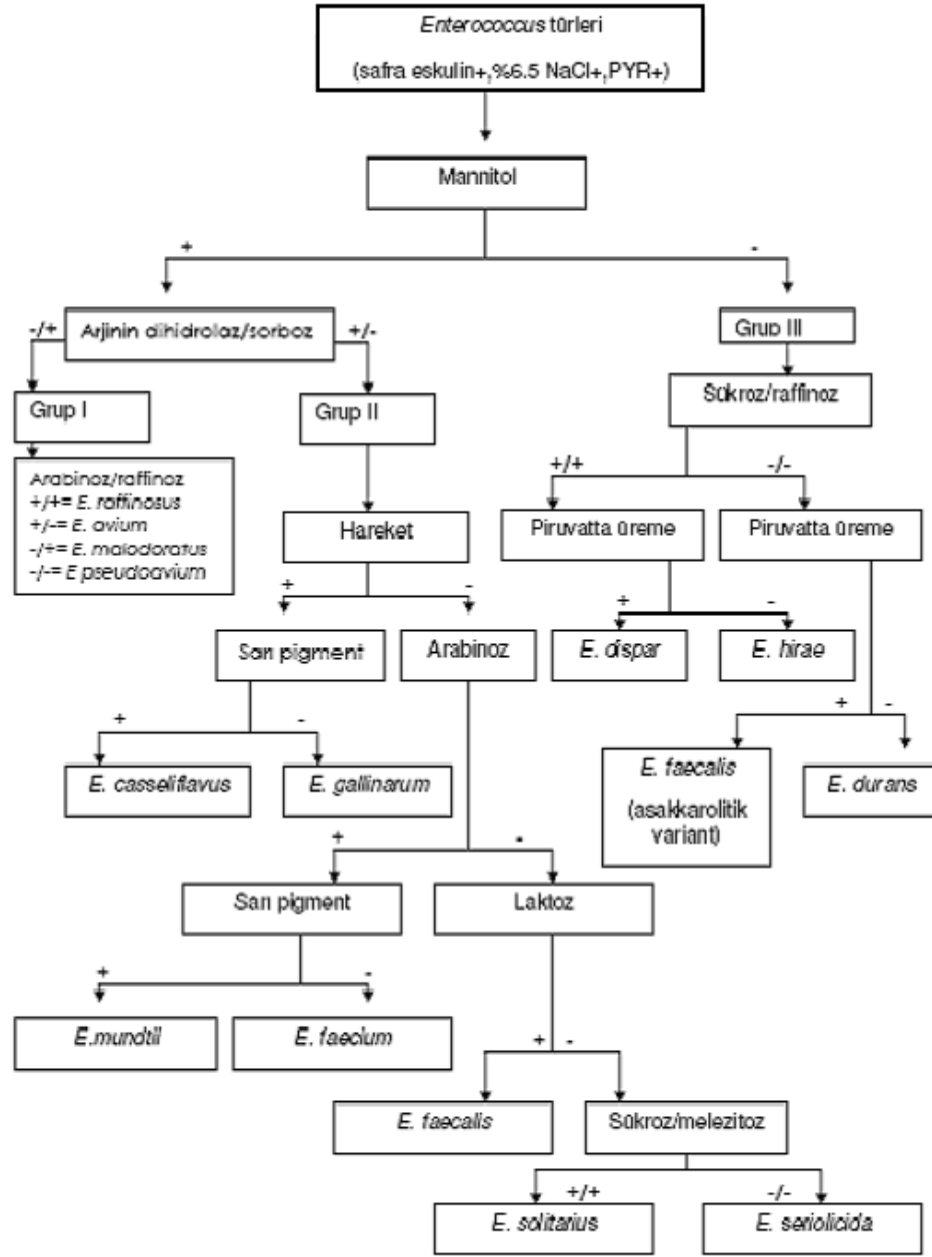
Grup 4: *E. sulfurens*, *E. asini*, *E. phoeniculicola* ve *E. cecorum* bu grupta bulunmaktadır. Bu gruptaki türler mannitol ve sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmaz ve arginini hidrolize etmezler. Sorbitol içeren sıvı besiyerinde ise *E. cecorum* asit oluştururken, *E. sulfureus* asit oluşturmaz.

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

Tablo 3. Enterokok türlerinin fenotipik özellikleri

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

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



Şekil 3. Enterokok türleri identifikasyon şeması

2.2.5. Genom özellikleri

ABD’de The Institute for Genomic Research (TIGR) ve Joint Genomic Institute of the Dept of Energy laboratuarlarında hastane enfeksiyonlarından en sık izole edilen *E.faecalis*, *E.faecalis* V583, ve *E.faecium*, *E.faecium* ATCC BAA-472, suşlarının tam genom dizi analizi yapılmıştır. Enterokokların G+C içeriği %37-45 arasındadır^{26,27}.

E.faecalis V583 genomu, 3.218.031 bp uzunluğunda olup 3182 open reading frame(ORF)'e sahiptir. Genlerin çoğu, türler veya özellikle *Streptococcus* ve *Staphylococcus* cinsleri arasında lateral gen transferi ile kazanılmıştır. VanB fenotipi gösteren ilk VRE suşu olan *E.faecalis* V583 suşunun, genomunun yaklaşık olarak %25'i mobil veya eksojen gen olarak kazanılmış DNA dizilerinden oluşur. Bu mobil elementler konjugatif ve kompozit transpozonlar, patojenite adaları, integre plazmid genleri ve faj bölgeleri ve çok sayıda insersiyon dizilerinden oluşur. Mobil gen elementlerinin kazanımı ilaç direncinin kazanımı ve yayılımına katkıda bulunmaktadır. Bu da enterokokların ilaç direncinde bir rezervuar olduğunun kanıtıdır. *E.faecalis* V583 suşunda kromozomal DNA dışında büyüklükleri 66320 bp, 57660 bp ve 17963 bp olan 3 plazmid bulunur. Plazmidler de sırası ile 72, 64 ve 19 ORF kodlanır. Plazmidlerin G+C oranı %34 civarındadır^{26,27}.

E.faecium genomu 2.928.706 bp büyüklüğünde olup, 3309 ORF içerir. Genomda toplam G+C oranı %37,8'dir^{26,27}.

2.2.6. Genetik bilgi transferi

E.faecalis ve *E.faecium* suşlarında, virulans genleri veya ilaç direnci ile ilgili genetik bilgi transferinde rol oynayan, çok sayıda plazmid, transpozon, patojenite adası, integre plazmid geni ve faj bölgesi ile oldukça fazla sayıda insersiyon dizileri, plazmid ve transpozon bulunmuştur¹³.

Enterokoklarda Rolling circle replicating plazmid (RCR), Inc18 plazmid ve feromon-responsive plazmid olmak üzere üç sınıf plazmid tanımlanmıştır. RCR ve Inc18 plazmidleri pek çok cinsten replike olabilirken, feromon-responsive plazmid replikasyonu sadece enterokoklarla özellikle de *E.faecalis* ile sınırlıdır. Plazmidi bulunmayan alıcı suşlar ekstraselüler feromon sentezleyerek, verici hücre dış yüzeyinde agregasyon faktör (AF) denilen proteinöz maddenin oluşumunu sağlar. AF alıcı hücrenin yüzeyine bağlanır ve alıcı ile verici hücrenin yaklaşması sonucu plazmid değişimi oluşur. Feromon ile indüklenmiş transfer, plazmid geçişini 10^5 - 10^6 kat artırır^{13,27}.

Enterokoklar ayrıca konjugatif transpozonlar ile de genetik bilgi değişimi yapabilir. Bunun için hücre-hücre teması gereklidir. Transpozonlar sıklıkla tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, kanamisin ve diğer aminoglikozidler gibi antimikrobiyal ilaçlara direnç genleri taşırlar. Konjugatif transpozon Tn916, *E.faecalis*'lerde tetrasiklin direncini kodlarken;

Tn1546 vankomisin direncini kodlayan Van A gen kümesini, Tn1547, Tn1549 ve Tn 5382 VanB operonunu, Tn5281 yüksek düzey gentamisin direncinden sorumlu aac(6') Ie-aph(2'') Ia genini taşır. Transpozonlar çok geniş bir konak spektrumuna sahip olup enterokokların yanı sıra streptokoklar, laktokoklar ve diğer Gram pozitif bakterilerde de bulunurlar. Konjugasyon ile ilişkili belirli moleküller, enfeksiyon sırasında immun modülatör rol oynayabildiğinden patojeniteye katkıda bulunurlar^{13,27}.

2.3. Virulans Faktörleri

Enterokoklar gastro-intestinal sistemde kommensal olarak bulunmalarına rağmen, belirli predispozan durumlarda barsak dışı bölgelere yayılarak hastalıklara sebep olurlar. Mikroorganizmanın antibiyotik direnci ve virulansla ilişkili yeni genetik materyal kazanabilme özelliği onu daha virulan yapar ve konakta farklı bölgelere kolonizasyonuna alışılmışın dışında enfeksiyon oluşturmaya yardım eder. Ancak kolay genetik bilgi transferi, mikroorganizmanın virulansından sorumlu tek faktör değildir. Yapılan çok sayıdaki çalışma ile mikroorganizmaya ait farklı virulans faktörleri bulunmuştur²⁶.

Mikroorganizmanın virulansı genomda bulunan patojenite adaları (PI) denilen özel bölgelerde ve plazmidlerde kodlanan virulans genleri ile düzenlenir. Enterokokların patojenite adaları ilk kez 1980 yılında nozokomiyal salgına yol açan ÇİD *E.faecalis*'te tanımlanmıştır. G+C oranı % 32,2, büyüklüğü de 150kb civarında olan bu **PI**; enterokokal surface protein(**esp**), agregasyon faktör (**asa**) ve sitolizin(**cyl**) gibi virulans genlerinin yanı sıra transpozazlar, transkripsiyonel regülatörler ve proteinleri kodlayan genlerin yer aldığı 129 ORF bölgesine sahiptir^{26,27,28,29,33}. Bu PI'nın bulunmasından iki yıl sonra *E.faecium* suşlarında *E.faecalis*'dekinden farklı olan bir **PI varlığı** bulunmuştur. *E.faecium* klinik izolatlarında "**esp**" geninin görülmesi bu türdeki patojenite adası için bir indikatör olarak kabul edilmiştir³⁰. Farklı VRE suşlarındaki **PI** dizilerinin karşılaştırılması sonucu; yüksek derecede dizi benzerlikleri olduğu ve spesifik gen bölgelerin değişen sıklıkta delesyona uğradıkları görülerek, bu mikroorganizmaların virulans düzenleme yeteneği kazandıkları gösterilmiştir. Diğer taraftan bu çalışmalarda **PI**'lerinin en az üçte birinin konjugatif bir plazmidin kromozoma integrasyonu ile oluştuğu ispatlanmıştır. Ayrıca **PI** larda fonksiyonu izah edilemeyen 18 ORF bölgesi kodlanmaktadır. Kommensal enterokokların **PI**lerinde bu

ORF bölgeleri gösterilememiş, bu sebeple de, bunların enterokokların hastane ortamında yaşamasına veya hastalık geçişine veya patogeneze katkıda bulundukları düşünülmüştür²⁶.

Enterokokların en önemli virulans faktörleri^{26,32,34};

1. Hemolizin veya sitolizin,
2. Jelatinaz,
3. Enterokokal surface protein,
4. Agregasyon faktörü,
5. MSCRAMM Ace (Microbial surface komponent recognizing adhesive matrix molecule adhesin of kollagen from Enterococci),
6. Kapsül, hücre duvarı polisakkaritleri
7. Lipoteikoik asit
8. Süperoksitler
9. Seks feromonları
10. Hyaluronidaz
11. Efa
12. AS-48
13. Antibiyotik direncidir.

2.3.1. Hemolizin/Sitolizin

Önceleri hemolizin olarak tanımlanan sitolizin, çeşitli *E.faecalis* izolatlarında bulunabilen, insan, at ve tavşan eritrositlerine karşı litik aktivite gösteren bir sitotoksik proteindir. Sitolizin eritrositler dışında, polimorfonükleer lökosit(PMNL)'ler, makrofajlar ve Gram pozitif organizmalar içinde litik aktivite gösterir. Buna karşılık toksinin koyun eritrositleri ve gram negatif bakterilere karşı inaktif olduğu gösterilmiştir. Sitolizin'in aynı zamanda bir bakteriosin olduğu ve litik aktiviteye ek olarak bütün Gram pozitif organizmalar için bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir²⁶. Sitolizin sıklıkla büyük bir feromon-responsif plazmid de, bazen de kromozoma integre olan bir patojenite adasında kodlanabilen bir toksindir^{33,36}. Sitolizin operonu *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, ve *cylH* olarak tanımlanan sekiz gen içerir. Aktif sitolizin subünitleri olan "*CylLL*" ve "*CylLS*" ribozomda sentezlenip posttranslasyonel modifikasyona uğrar ve sonra ekstrasellüler ortama sekrete edilerek aktive olur. "*cylR1*" ve "*cylR2*" iki ayrı regülatör

gendir ve sitolizin yapısal genlerinin transkripsiyonunu baskırlarlar^{32,35}. Sitolizin üretimi için bir quorum-sensing mekanizması olduğu bildirilmiştir. *CylLS* sekresyonunu sağlayan quorum-sensing mekanizması ile sitolizin ekspresyonu indüklenir^{31,34,36}. Ayrıca başka bir çalışmada sitolizin yapısal subünitlerini kodlayan *cylLL* ve *cylLS* genlerinin regülasyonunun ortamın oksidasyon redüksiyon(Eh) potansiyeli ile ilişkili olduğu, düşük Eh potansiyeline sahip ortamlarda regülasyonun, yani sitolizin üretiminin arttığı gösterilmiştir. Sitolizin operonu, sitolizin dışında *af* ve *esp* gibi diğer virulans genleri ile de ilişkilidir^{32,33}.

Sitolizin'in enterokokların virulansına ve enterokoksik hastalıkların prognozuna etkileri kesin olarak belirlenememiştir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada enfeksiyon ile ilişkili materyalden izole edilen *E.faecalis* suşlarının % 60'ının ve gaita izolatlarının ise %17'sinin sitolizin ürettiği bulunmuştur. Ancak benzer amaçlı çok sayıdaki çalışmada ise endokardit, bakteriyemi ve gaita izolatlarında sitolizin üretiminde farklılık bulunamamıştır. Moleküler düzeyli son çalışmalara göre; klinik *E.faecalis* izolatlarında sessiz bulunan *cyl* geni negatif fenotipik profile yol açarken, enfeksiyon bölgesinde bulunan çevresel faktörler ile bu genlerin aktive olabildiği gösterilmiştir³².

2.3.2. Jelatinaz

Enterokoklar tarafından üretilen jelatinaz, jelatin, kollajen, fibrinojen, kasein, hemoglobin, insülin ve bazı bioaktif peptitleri hidrolize edebilen, matriks metallo proteinaz (MMP) ailesinin ekstra selüler çinko içeren bir üyesidir³². Jelatinaz üreten *E.faecalis* suşlarının akut toksik etkilerinin daha fazla olduğu ve hayvan modellerinde endokardit oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Jelatinaz üretiminin inhibisyonunun doku kültüründe kemik rezorbsiyonunu azalttığı da gösterilmiştir. Ayrıca inflamatuvar hücreler, epitelyal hücreler, fibroblast ve osteoklast gibi memeli hücreleri tarafından da üretilen jelatinaz, ekstra selüler matriksi degrade etmektedir³².

Enterokoklarda jelatinaz enziminin varlığı ilk kez 1964 te *E.faecalis* suşlarında gösterilmiştir. *E.faecalis* suşlarında jelatinaz üretimini, Stafilokokal accessory gen regülatör lokusu (AGR) nun bazı bölümlerine benzer dizi içeren "*fsr*" lokusu regüle eder. Farklı klinik materyalden izole edilen *E faecalis* suşlarında jelatinaz üretim oranlarının farklı olduğu gösterilmiştir. Genel olarak tüm izolatların yaklaşık olarak % 45-68 inde

jelatinaz üretiminden sorumlu olan “*fsr*” gösterilmişken; bir çalışmada bu gen, endokardit izolatlarının %100’ünde, gaita izolatlarının ise %53 ünde tespit edilmiştir^{26,32}.

2.3.3. Enterokokal Surface Protein ESP

Yüksek moleküler ağırlığa sahip, enterokokal surface proteini –*Esp*-, 153 kb büyüklüğündeki bir patojenite adasında yer alan *esp* geninde kodlanır ve konjugasyonla enterokok izolatları arasında aktarılabilir. *Esp*, salgına yol açan *E.faecalis* ve *E.faecium* izolatlarında bulunduğundan, epidemik suşları gösteren bir marker olduğu düşünülmektedir^{37, 39}.

Esp, bakteriyemi ve endokardit ile ilişkili suşlarda yüksek oranda bulunurken, gaita kökenli izolatlarında nadiren bulunur. *Esp*’nin karboksi-terminal ucu ile, üriner sistem enfeksiyonlarında musin veya uroplakin gibi mesane duvarı komponentlerine bağlanarak, bir kolonizasyon faktör gibi *E.faecalis*’in mesane epiteline yapışmasını sağladığı, persistense katkıda bulunduğu ve biyofilm oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir. Proteinin iç kısmında tekrarlayan birimlerden oluşan ve moleküle uzayıp kısalma özelliği kazandıran bir bölge bulunmaktadır. Bu size varyasyonlarının bakterinin immün cevaptan kaçışını kolaylaştırdığı düşünülmektedir^{26, 31, 32,38}.

2.3.4. Agregasyon faktörü(Af):

Agregasyon faktör(Af), bakteri yüzeyinde yer alan saça benzeyen, protein yapıda bir adhesindir. Hücre-hücre temasını düzenleme, hücre dışı matriks proteinlerine adhezyonla konak hücreye yapışma ve hücre yüzey hidrofobisitesini arttırma gibi özellikleri ile virulansa katkıda bulunan *Af*, feromon-responsif plazmidde kodlanır. Nötrofil ve makrofajlarla oluşan cevap değişkenlik gösterir; ancak *Af*’ün konak defansına karşı koruyucu faktör olarak görev yaptığı sonucuna varılabilir. *Af*’ye sahip olan enterokoklar, kompleman reseptörü yoluyla nötrofillere opsonizasyondan bağımsız olarak bağlanırlar. Bu tür bağlanma nötrofiller tarafından bakterinin öldürülmesini engeller. Makrofajlar tarafından fagositozda ise, reaktif oksijen türleri üretimi ile oksidatif patlama inhibe edilerek, fagositik yıkıma karşı direnç gösterilir. Diğer taraftan *Af* içeren suşlarla indüklenmiş PMNL’lerde hem ekstraselüler süperoksit üretimi hem de fagozomal oksidan

üretimi daha fazla olmaktadır. Bu oksidatif patlama enfeksiyonu sınırlandırmanın yanı sıra enterokoklarla oluşan doku hasarına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca süper antijen aktivitesine sahip olan *Af* nin T hücre proliferasyonunu, proliferen T hücrelerden TNF- β ve IFN- γ ve makrofajlardan da TNF- α salınımını indüklediği gösterilmiştir^{26,31,32}.

Alıcı ve verici bakteriler arasında temasa aracılık eden *Af*, plazmid transferini kolaylaştırır. Konjugasyon sırasındaki bakterilerin böbrek tübüler hücresine ve barsak epiteline integrinler yoluyla adhezyonuna aracılık eder. Bakterinin kollajen tip1 gibi ekstraselüler matriks proteinlerine bağlanmasını sağlar. Özellikle kateter enfeksiyonların da *E.faecium*'a göre daha sık görülen *E.faecalis*'lere katetere tutunma yeteneği sağlamaktadır^{25,34}.

2.3.5. MSCRAMM Ace (Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule adhesin of kollagen from Enterococci),

Yapısal ve fonksiyonel olarak *S.aureus*'un kollajen bağlayan proteini *Cna*'ya benzer özelliklere sahip olan *MSCRAMM Ace*, hücre dışı matriks proteinlerine bağlanmayı sağlayan protein yapıda bir adhezindir. Enterokoksik enfeksiyonlarda, özellikle *E.faecalis* endokarditlerinde *Ace* yaygın olarak eksprese edilir. Klinik izolatlarda fekal izolatlardan daha yüksek oranda bulunmaktadır⁴¹. Ayrıca bakterinin dentine adhezyonunda da etkilidir^{26,32}.

2.3.6. Kapsül, Hücre Duvarı Polisakkaritleri

Klinik *E.faecalis* izolatlarında yaygın olarak üretilen kapsül polisakkaritini kodlayan bir operon bulunmaktadır. Bunun dışında hem *E.faecalis* hem de *E.faecium* izolatlarında ikinci bir kapsül polisakkariti daha tanımlanmıştır. Her iki polisakkaride karşı oluşan antikorlar koruyucudur. Enterokoklarda hücre duvarı, beta-D glikoz-1-fosfat, teikoik asit ve tetraheteroglikan komponentlerinden oluşur. Opsonik antikorlar için hedef olan bu yapılarda virulansın yanı sıra karşı koruyucu immünite için hedef rolü oynarlar. Bu sebeple aşı oluşturmadaki önemleri araştırılmaktadır²⁶.

2.3.7. Lipoteikoik asit-LTA

LTA, poligliserol fosfat omurgasına kovalent bağlarla glikolipit rezidülerin bağlanması ile oluşan bir amfipatik moleküldür. Bu molekülün lipit parçası; trombosit, eritrosit, lenfosit, PMNL ve epitel hücresi gibi pek çok ökaryotik hücreye bağlanabilmektedir. *E.faecalis* suşlarında adhezif özelliği gösterilen LTA'nın donör hücre tarafından üretilen agregasyon faktörü için alıcı hücrede reseptör olarak fonksiyon gördüğü ve bu yüzden plazmid transferi ve agregat oluşumunu kolaylaştırarak *E. faecalis*'in virulansına katkıda bulunduğu düşünülmektedir^{32,42}.

E.faecalis ve diğer bazı gram pozitif bakterilerde LTA'nın immunomodülatör gibi rol oynayarak PMNL'den, TNF- α , IL1- β , IL6, IL8 ve PGE-2 gibi inflamatuvar mediyatörlerin, süperoksit radikallerinin ve lizozomal enzimlerin salınımını artırdığı gösterilmiştir. Hücre ve doku kültüründe yapılan çalışmalarda streptokokların LTA'inin apoptotik hücre hasarına sebep olduğu gösterilmiştir. *Enterococcus hirae* ATCC 9790 suşunun LTA'inin otolizisi inhibe ettiği tespit edilmiştir^{32,42}.

2.3.8. Süperoksitler

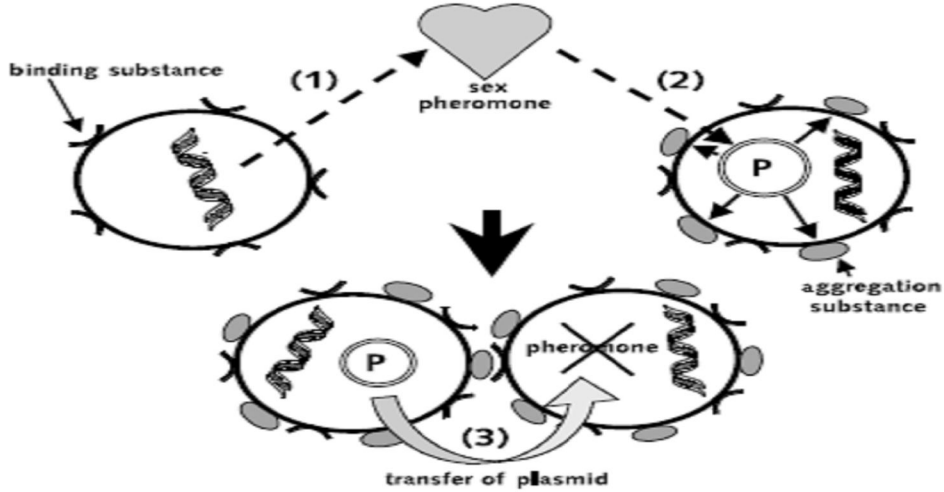
E.faecalis'lerin çoğu ve bazı *E.faecium* türleri tarafından ekstraselüler süperoksitlerin sentezlenip mikro-çevreye salındığı, bunun da bakterinin hayat süresini uzattığı gösterilmiştir. Enterokoksik bakteriyemi ve endokarditli hastalardan izole edilen klinik suşların gaita kökenli izolatlardan daha yüksek oranda süperoksid radikali ürettiği gösterilerek, süperoksid üretiminin virulansla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür^{26,32,34}.

2.3.9. Seks Feromonları

Seks feromonları kromozomda kodlanan, 7-8 amino asit uzunluğunda küçük, hidrofobik peptitlerdir. *E.faecalis*'te sinyal peptitleri olarak fonksiyon görürler. *E.faecalis*'te belirli konjugatif plazmidlerin transferi seks feromon sistemi ile birkaç kat artırılır. Alıcı bir suş besiyerine plazmidle uyumlu ancak onunla taşınmayan seks feromonları sekrete eder, cevap olarak verici suş *Af* sekrete eder. Böylece alıcı ve verici hücre arasında sıkı temas sağlanır ve konjugatif plazmidin geçişini kolaylaştırır^{32,34,44}.

(Şekil-4). Ayrıca antibiyotik direnci ve sitolizin gibi virulans faktörleri seks feromon sistemi ile *E.faecalis* suşları arasında yayılabilir³².

Bazı seks feromonları nötrofiller için kemotaktiktir, süper oksit üretimini ve lizozomal enzim sekresyonunu indükler ve doku hasarı oluşturur³².



Şekil 4: Seks-feromon sistemi transfer mekanizması

2.3.10. Hyaluronidaz

Streptokokların dışında stafilokoklar gibi bazı gram pozitif bakterilerde hyaluronidaz geninde *-hyl-* kodlanan hyaluronidaz enzimi, doğada sülük ve kancalı kurtlar gibi parazitler, zehirli yılanlar ve spermatozoa gibi memeli hücreleri tarafından da üretilir. Hyaluronidaz, hyaluronik asiti tahrip ederek doku hasarına yol açan bir enzimdir. Bağ dokudaki mukopolisakkaritlerin bir kısmını depolimerize ederek bakterinin yayılmasını sağlar. Ayrıca hyaluronik asidin degradasyon ürünü olan disakkaritler de bakteriler için besin kaynağı olabilir. Hyaluronidaz kendi zarar verici etkilerine ek olarak, diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerini kolaylaştırabilir ve doku hasarının şiddetini artırır. Diş çürüklerindeki doku hasarında rol oynayan hyaluronidaz enzimi, enterokokların kök kanalından periapikal lezyonlara geçişini kolaylaştırmaktadır^{25,32}.

2.3.11-Enterococcus faecalis antijen A Proteini (EfaA proteini)

İlk olarak endokarditlerden izole edilen *E.faecalis* suşlarında tanımlanan **EfaA** proteini, *efaA* geninde kodlanır. **EfaA**'nın aminoasit dizisi, streptokokal adhesinler olarak bilinen proteinlerle %55-60 homoloji göstermektedir. *EfaA*, mangan transport sistemi için solut bağlayan protein reseptörüdür. Mikroorganizmanın yaşaması ve çoğalması için mangan gerekir ve *efaA* mangandan fakir ortamda fazla miktarda eksprese edilir. *EfaA*, endokarditler de adhesin olarak fonksiyon gördüğü, ancak bütün klinik örneklerden, hastane ortamından, süt, peynir ve et gibi gıda izolatlarından izole edilen *E. faecalis* suşlarında da *efaA*'nin bulunduğu gösterilmiştir³².

2.3.12. AS-48

İlk olarak *E.faecalis* S-48 suşundan izole edilmiştir. Plazmid de kodlanan peptit yapılı bir bakteriyosin olup gram pozitif ve gram negatif birçok bakteriye karşı sitolitik aktivite gösterir. Pozitif şarjlı olduğu için ve iyon geçişini indüklemesinden dolayı, hedef hücrede sitoplazmik membran potansiyelinin bozulmasına yol açtığı düşünülmektedir³².

2.3.13- Antibiyotik Direnci

Nozokomiyal enterokokal enfeksiyonlar, hastanın antibiyotik kullanımı sonucu intestinal florasında bulunan duyarlı suşların ortadan kalkmaları ile birlikte antibiyotik dirençli, sitolitik toksin oluşturma gibi virülans özelliklerine sahip suşların intestinal flora hakim olması ile başlar. Bu suşlar translokasyonla endojen kökenli çevreye yayılmak sureti ile de duyarlı hastalarda ekzojen kökenli enfeksiyonlara yol açarlar. Bu suşlarda görülen antibiyotik direnci suşların intestinal florada seçilip çoğalmasını kolaylaştırırken, sitolitik toksin ve jelatinaz gibi faktörler de doku invazyonunu kolaylaştırmaktadır^{43,57}.

2.4. Enterokoklarda Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

Enterokoklar diğer gram pozitif bakterilerin duyarlı olduğu birçok antibiyotiğe kısmen veya tamamen dirençlidir. Bu sebeple enterokok enfeksiyonlarının tedavisi klinikte karşılaşılan en önemli sorunlardan birisidir.

Enterokoklar da antibiyotiklere direncin mekanizması iki ana grupta incelenebilir.

1-İnterensek (doğal-kromozomal) Direnç

2-Eksterensek (kazanılmış) Direnç

2.4.1. İnterensek Direnç

İnterensek direnç türe/cinse özgüdür. Enterokok türlerinin tamamında görülen kromozomal direnci ifade eder. Mesela enterokok türleri penisilinlere, sefalosporinlere, linkozamidlere, trimetoprim-sulfametaksazol (TMP-SMX)'e, aminoglikozidlere (düşük düzeyde), polimiksinlere, monobaktamlara ve kinopristin/dalfopristin'e karşı kalıtsal olarak dirençlidir^{5,43}.

2.4.1.1. β -Laktam direnci

Enterokoklar β -laktam antibiyotiklere karşı karakteristik olarak tolerans gösterirler, yani tedavi dozunda Minimum bakterisidal konsantrasyon/minimum inhibitör konsantrasyon (MBK/MİK) oranı 1/32'nin üzerindedir. Bu nedenle β -laktam antibiyotikler enterokoklara karşı bakterisidal değil, bakteriyostatik etkilidir. Enterokoklarda interensek penisilin direnci, β -laktam antibiyotiklere düşük bağlanma afinitesi gösteren penisilin bağlayan protein 5 (PBP-5) enziminin varlığına bağlıdır. *E.faecalis* suşlarında penisilin MİK değeri streptokoklardan 10-100 kat daha yüksektir. Diğer taraftan da *E.faecium* suşlarında penisilin direnci *E.faecalis*'e oranla daha sık görülmektedir. Enterokoklarda yarı sentetik ve penisilinaza dirençli β -laktam antibiyotiklere karşıda intrensek direnç oldukça yüksek oranda bulunmuştur. Ampisilin direnci *E. faecium* suşlarının %85–90' ında, *E.faecalis* suşlarının ise %2-3'ünde görülmektedir^{5,44, 49}.

2.4.1.2-Aminoglikozid direnci

Enterokoklarda görülen düşük düzeyde aminoglikozid direnci, bu grup ilaçların bakteri içerisine girişinin az olmasından kaynaklanır. Aminoglikozidler bakteri hücre duvarından enerji bağımlı mekanizma ile geçtiklerinden ve enterokoklarda sitokrom enzimleri olmadığından geçirgenlik azalmaktadır. Ancak aminoglikozid grubu ilaçlar, hücre duvarı sentezini engelleyen β -laktam'lar gibi antibiyotikler ile kombine edilirse zedelenen hücre duvarından daha kolay geçeceklerinden sinerjistik etki oluşacak ve MİK değerleri önemli ölçüde düşecektir^{43,44, 49}.

2.4.1.3 Diğer antibiyotikler

Enterokoklar linkozamid grubu antibiyotiklere karşı da düşük düzeyde direnç gösterirler. Ayrıca enterokokların eksojen folatı kullanma yetenekleri olduğundan TMP-SMX'e de interensek olarak dirençlidirler. İn-vitro şartlar da duyarlı görülseler de, in-vivo şartlarda etkisiz olduklarından antibiyotik duyarlılık testlerinde TMP-SMX kullanılmamalıdır. *E. faecalis* intrensek olarak quinupristin/dalfopristine'de dirençlidir. *E.gallinorum*, *E.casseliflavus* ve *E.flavescens*'te interensek olarak Vankomisine düşük düzeyde direnç gösterirler^{5,43}.

2.4.2. Eksterensek Direnç

Kazanılmış direnç genellikle DNA mutasyonları veya transpozon, plazmid veya patojenite adaları gibi yeni bir DNA segmentinin genoma transferi sonucu gelişir. En sık görülen mekanizma konjugasyondur.

2.4.2.1 β -laktam Direnci

β -laktam direnci Enterokok cinsi bakterilerin tipik özelliğidir. Enterokoklar iki ayrı direnç mekanizması ile β -laktam antibiyotiklere direnç kazanır. Direncin major mekanizması, kromozomal olarak düşük afiniteli PBP5 miktarının artması sonucu penisilinin hücre içine girişinin azalmasıdır. Penisilin direnci, enterokoklarda bulunan

PBP5 miktarı ile doğru orantılıdır ve sıklıkla *E.faecium* suşlarında görülür. PBP5 sentez yeteneğinin kaybının, penisiline oldukça dirençli suşların hiper duyarlı olmasına neden olduğu gösterilmiştir^{5,49}.

β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direncin diğer mekanizması ise β -laktamaz üretimidir. β - laktamaz üreten enterokoklar nadir olarak izole edilmektedir. β -laktamaz üreten ilk suş 1981 yılında Murray ve arkadaşları tarafından ABD’de tanımlanmıştır. β -laktamazların çoğu yüksek düzeyde gentamisin direnç genini de taşıyan bir plazmid üzerinde kodlanmıştır. Enterokoklardaki β -laktamazlar penisilin, ampisilin, piperasilin ve diğer üreidopenisilinleri hidrolize eder; penisilinaza dirençli penisilinleri, sefalosporinleri ve imipenemi etkilemez. Stafilokoklardan farklı olarak, enterokoklarda β -laktamaz üretimi konstitüf, düşük seviyede ve inokülüm bağımlıdır^{5,44,49}.

2.4.2.2 Aminoglikozid Direnci

Enterokoklar aminoglikozidlere karşı direnç da iki farklı mekanizma ile ortaya çıkar.

a-İlımlı seviyede direnç (MIK= 62-500 $\mu\text{g/ml}$) : genellikle düşük permeabiliteden dolayı gelişir. Aminoglikozidlerin hücre duvarı sentezini inhibe eden β -laktam grubu antibiyotiklerle kombine edilerek kullanımı ile bu tip direnç problemi aşılabılır.

b-Yüksek seviyede direnç (MIK>2000 $\mu\text{g/ml}$): aminoglikozidlerin ribozomdaki bağlanma bölgelerindeki değişiklik sonucu veya aminoglikozidleri inaktive eden enzimlerin sentezi sonucu oluşur.

Yüksek düzeyli dirence yol açan bu iki yoldan aminoglikozid modifiye eden enzim üretimi en sık görülen direnç mekanizmasıdır. Bu enzimler ile ilişkili genler plazmid veya transpozonda yerleşmiş olup, asetil transferaz, adeniltransferaz ve fosfotransferaz olmak üzere üç tip enzim kodlarlar.⁴⁴

Enterokoklarda gentamisin ve streptomisine karşı direnç farklı mekanizmalarla oluştuğundan, duyarlılık testlerinde bu ajanların ikisinin de kullanılması önemlidir. Streptomisin hariç diğer aminoglikozidlere yüksek seviyede dirençten yaygın olarak bifonksiyonel enzim olan 6’Asetil transferaz-2’’fosfotransferaz -AAC(6’)-APH(2’’) sorumludur. Bu enzim, gentamisin, tobramisin, netilmisin, amikasin ve kanamisine

direnç oluşumunu sağlar. Bu yüzden gentamisin direnci, streptomisin hariç diğer aminoglikozitlere olan direncin iyi bir göstergesidir. Streptomisin direnci ise ribozomal mutasyonlar veya Adenil transferaz sentezlenmesi sonucu oluşmaktadır ve bu suşlar gentamisine duyarlı kalmaktadır⁴⁴. Penisilin-aminoglikozid sinerjisi, streptomisin'in MİK değerinin 2000 µg/ml, gentamisin'in MİK değerinin 500 µg/ml veya daha yüksek olduğu yüksek seviyede aminoglikozid direnci olan enterokoklarda ortaya çıkmamaktadır⁵.

2.4.2.3. Kloramfenikol direnci

Enterokokların %20-42'si kloramfenikole dirençlidir ve dirençten sorumlu esas mekanizma, plazmid üzerinde “*cat*” geni ile kodlanan kloramfenikol asetil transferaz üretimidir. Ayrıca efluks mekanizması da dirençte rol alabilir⁴³.

2.4.2.4. Tetrasiklin direnci

Dirençten sorumlu *tetM*, *tetQ* ve *tetN*, *tetL* gibi çok sayıda gen tanımlanmıştır. *tetL* geni bir plazmid de taşınır. Bu genler efluks sistemini kodlayabildiği gibi ribozomal kaynaklı dirence de sebep olabilir⁴³. Tetrasiklinlerin hücre dışına pompalanmasını sağlayan gen, tetrasiklin ile temas sonucu indüklenir. Tetrasiklin direnci enterokoklarda konjugasyon yolu ile kazanılan direncin en tipik örneğidir⁴⁴.

2.4.2.5. Kinolon direnci

Direnç *gyrA* (giraz) ve *parC*(topoizomeraz) genlerindeki mutasyonlara bağlı gelişir. Enterokokal suşların çoğunluğu kinolonlara intermediate duyarlılık veya direnç gösterir⁴³.

2.4.2.6. MLS_B (Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin) direnci

Genellikle 23S rRNA'nın metilasyonundan sorumlu *ermB* geni ile ilişkilidir ve metilasyon sonucu eritromisin ribozomlara bağlanamaz. *ermB* geni *Tn917* transpozonu

ile çeşitli plazmidler üzerinde taşınabilmektedir. Ayrıca asetil transferaz veya eflüks mekanizması sonucu da oluşabilir⁴³.

2.4.2.7. Oksazolidinon direnci

Çoklu ilaç direnci gösteren enterokoklar ile oluşan enfeksiyonlarda oksazolidinon grubu antibiyotik olan linezolid iyi bir seçenektir. Ancak 2002 yılında linezolid direnç bildirilmiştir ve bu dirençten 23S rRNA V domainindeki mutasyonlar (G-2576- T) sorumlu tutulmaktadır^{43,45,46}.

2.4.2.8 Glikopeptit Direnci

Enterokoklarda vankomisin ve teikoplanin en çok kullanılan glikopeptitlerdir. Enterokoklarda, normal şartlar altında, peptidoglikan sentezinde, iki molekül D-Alanin bir ligaz enzimi ile bağlanır ve “D-Ala-D-Ala” yı oluşturur. Daha sonra UDP-N-asetil muramil tripeptide eklenerek UDP-N-asetil muramil pentapeptit meydana getirir. Bu peptid oluşmaya başlayan peptidoglikana bağlanır, kros bağların oluşumunu sağlar ve peptidoglikan tabakanın gücüne katkıda bulunur. Vankomisin pentapeptit prekürsör ünitesinin D-Ala-D-Ala kısmına yüksek affinite ile bağlanır ve peptidoglikan zincire bağlanmasını bloke ederek kros bağların oluşumunu önler. Ancak peptidoglikan zincirine D-Ala-D-Ala yerine ligaz enzimi ile D-Ala-D-Laktat veya D-Ala-D-Serinin sentezlenerek bağlanması sonucunda, vankomisinin buraya bağlanma yeteneği azalır, hücre duvarı sentezi devam eder ve sonuç olarak vankomisine karşı direnç gelişir. Direncin sınıflandırılması önceleri, fenotipik olarak, MİK değerlerine göre yapılmıştır. Günümüzde ise sınıflandırma spesifik ligaz genlerinin varlığına göre yapılmaktadır. VanA, VanB, VanD ve VanG tipi dirençte D-Ala-D-Laktat, VanC ve VanE tipi dirençte ise, D-Ala-D-Serin sentezlenmektedir^{5,44,48}.

2.4.2.8.1. Fenotipik tanımlama

Fenotipik olarak Vankomisin direnci, VanA, VanB, Van C, Van D, Van E ve Van G olmak üzere 6 farklı tipte oluşabilir. VanA ve VanB direnç fenotipi,

enterokoklarda önceden bulunmayan, yeni kazanılmış gen dizilerinden kaynaklanır ve ilk olarak *E.faecium* ve *E.faecalis* suşlarında tanımlanmıştır^{5,44}.

VanA tipi dirençte; indüklenebilir yüksek seviyede vankomisin ($MİK \geq 64$ µg/ml) ve teikoplanin direnci ($MİK \geq 16$ µg/ml) görülür. Direnç vankomisin, teikoplanin, avoparsin ve ristosetin gibi glikopeptitler ve basitrasin, polimiksin B ve robenidin gibi nonglikopeptitler ile indüklenebilir^{5,44,47}.

VanB tipi dirençte ise; vankomisine daha ılımlı seviyede indüklenebilir direnç [Vankomisin $MİK \geq 32-64$ µg/ml (4-1000 µg/ml)] görülürken teikoplanine duyarlılık devam etmektedir. VanA direnç determinantları, tüm enterokok izolatları arasında transfer edilebilen büyük mobil bir elementte yerleşmişken, VanB sadece *E.faecalis* ve *E.faecium* suşlarında görülür^{5,44}.

VanC tipi direnç ise *E.casseliflavus* ve *E.gallinorum*'da tanımlanmıştır ve intrinsik düşük seviyede vankomisin direnci ($MİK \geq 4-32$ µg/ml) ve teikoplanine duyarlılık görülür^{5,44,47}.

Tablo 4. Enterokoklarda direnç fenotiplerinin özellikleri

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

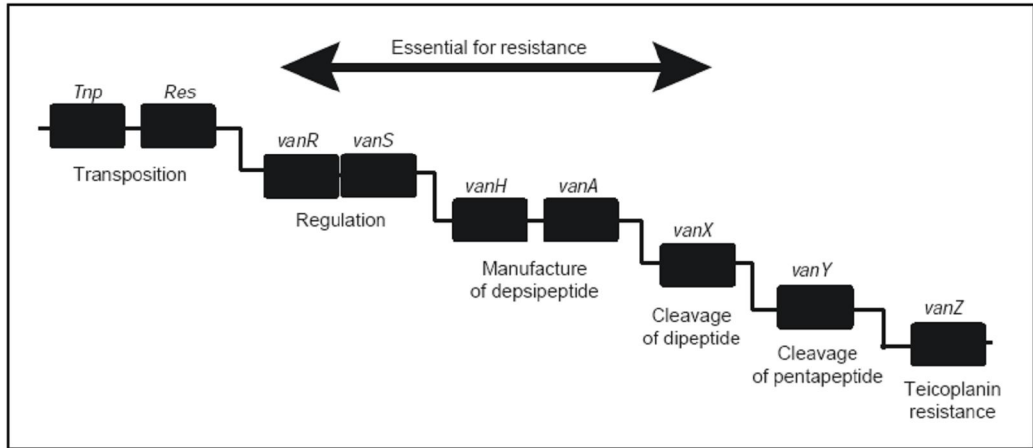
Bu sınıflandırma metotlarının bazı dezavantajları vardır. Örneğin VanA fenotipinin genetik göstergeleri *E.gallinorum* ve diğer enterokoklarda ortaya çıkmaktadır⁵⁰. Bir VanA tipi direnç görülen *E.avium* suşunda, teikoplanine tipik seviyede direnç olmasına karşın vankomisine daha düşük seviyede direnç (MİK $\geq$ 16 µg/ml) tespit edilmiştir. Ayrıca VanB suşlarından köken alan mutantlar, teikoplanine direnç gösterebilmekte ve bu yüzden de fenotipik olarak VanA suşlarından ayırt

edilememektedir. Bu dezavantajlarına rağmen, fenotipik sınıflandırma şeması, laboratuarlarda kolay kullanımı, düşük maliyeti ve genotipik sınıflandırma ile iyi uyum göstermesi sebebi ile hala kullanılmaktadır⁵.

2.4.2.8.2. Genotipik tanımlama

2.4.2.8.2.1. VanA glikopeptit direnci

VanA tipi direnç en sık karşılaşılan dirençtir. Vankomisin tarafından yüksek, teikoplanin tarafından ise zayıf indüklenebilir özellikte, yüksek düzeyde bir dirençtir. *vanA* geni ve direnç ekspresyonu ile regülasyondan sorumlu *vanS*, *vanR*, *vanH*, *vanX* ve *vanZ* gibi diğer genler, *E. faecium*'da sıklıkla bir plazmid üzerinde bulunan 10581bp'lik bir transpozon (Tn 1546) da yerleşmektedir. Bu genlerin ekspresyonu sonucu, peptidoglikan prekürsörlerin terminalinde D-Ala-D-Ala yerine D-Ala-D-Laktat sentezlenmekte ve vankomisin bu bileşiğe daha düşük affinite ile bağlanmaktadır^{5,47,48}. VanA operonunda *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* ve *vanZ* genleri yer alır. (Şekil 5)



Şekil 5: VanA operonu

VanR ve VanS proteinleri, *VanHAX* gen kümesinin transkripsiyonunu düzenleyen iki komponentli bir regülatör sistem oluşturur. *van S*, sensör gendir ve

vankomisin varlığını algılamada veya tanımada rol alan VanS proteinini kodlar. *vanR*, regülatör gendir ve diğer direnç genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunda görev alan VanR proteini kodlar. VanS, VanR ye sinyal verir ve dirençte yer alan VanH, VanA ve VanX gibi diğer bazı proteinlerin sentezi veya aktivasyonu ile sonuçlanan regülatör cevabı oluşturur. VanA tipi suşlarda hem vankomisin hem de teikoplanin transkripsiyonu indükleyebilir ancak kesin sinyaller hala bilinmemektedir.

VanA, VanH ve VanX proteinleri kor proteinleridir

VanA, D-Ala-D-laktat oluşumunu sağlayan bir ligaz proteini kodlar. VanA tek başına vankomisin direncini sağlayamaz, çünkü D-Laktat gibi D-hidroksi asitler, enterokoklarda genellikle sentezlenmez ve enterokokların çevresinde doğal olarak bulunmazlar. Bu yüzden D-laktat sentezlemek için enterokoklar, VanA için substrat üretiminde gerekli olan *vanA* operonu içindeki genleri kazanmalıdır. **vanH**, piruvattan D-Laktat sentezini sağlayan bir dehidrogenaz enzimini kodlar ve D-laktat havuzunun oluşumunu sağlar. **vanX**, bir DD-dipeptidaz enzimi olan VanX proteinini kodlar. D-Ala-D-Ala havuzunu doğal bir enterokokal ligaz ile azaltarak, yarışma sureti ile normal pentapentit sentezini azaltır. D-Ala-D-Laktata karşı aktivitesi yoktur. **vanY**, DD-karboksiptidaz olan VanY proteinini kodlar ve peptidin sonundaki D-Ala yı ayırır ve ılımlı seviyede direnci sağlar. **vanZ**, ılımlı olarak teikoplanin MİK değerini artırır ama vankomisin MİK değerini arttırmaz. Bunun mekanizması henüz aydınlatılmamıştır. *vanY* ve *vanZ* dirence katkıda bulunabilir ama direnç için zorunlu değildir.

“*vanA*” geni ilk olarak *E.faecium*’da, sonraları ise *E. faecalis*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. mundtii*, *E.casseliflavus*, *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türlerinde de belirlenmiştir.

VanA tipi direnç Avrupa’da en çok görülen direnç tipidir. ABD’de VanB suşları oldukça yaygın olmasına rağmen VanA hala daha baskın direnç tipidir. *vanA* ligaz geni enterokokal türlerin büyük kısmında ve *Corynebacterium* sp, *Arcanobacterium haemolyticum* ve *Lactococcus* spp lerde bulunmaktadır. ABD izolatlarında *vanA* gen kümesinin haritalanmasında bazı heterojenlikler görülmüştür. Tn 1546 bazı suşlarda intakt olarak bulunur fakat bazılarında *vanS* ve *vanH* arasında yer alan insersiyon dizisi de vardır. Bu vankomisin direnç genleri, ek olarak insersiyon elementleri içeren daha büyük mobil elementlere inkorpore olabilir^{5,47,48}.

2.4.2.8.2.2. VanB glikopeptit direnci

Enterokoklarda VanB glikopeptit direnci yapısal olarak VanA ligaz ile %76 amino asit benzerliği gösteren anormal bir ligaz olan VanB ile oluşturulur. VanA'da bulunan genlerden VanZ hariç altı tanesi VanB de bulunmaktadır. *vanB*, kromozomal yerleşimlidir. Ancak transpozon,-Tn 1547 ve Tn 5382- veya plazmid üzerinde de taşınabilir ve transfer edilebilir^{5,44}.

VanB proteini, D-Ala-D-Laktat ile sonlanan pentapeptit oluşumuna yardımcı olur. VanA direncine benzer genler; *vanH_B*, *vanX_B*, *vanY_B*, *vanR_B* ve *vanS_B* ile gösterilir. D-D dipeptidaz (VanX_B) aktivitesinin seviyesi vankomisin direnç düzeyi ile ilişkilidir. VanHAX ve VanH_BBX_B arasında yaklaşık %70 dizi benzerliği bulunurken, VanA ve VanB tipi VRE lerin RS ve Y proteinleri arasında %25-35 dizi homolojisi varır. Bu organizmalarda *vanZ*' ye benzer gen yoktur. *vanY_B* bütün suşlarda bulunmaz ve gendeki pozisyonu Tn1546daki *vanY*'den farklıdır.

Son çalışmalarda *vanB* ligaz geninin DNA dizi heterojenitesi gösterdiği ve *vanB-1*, *vanB-2* ve *vanB-3* olmak üzere 3 subtipi olduğu gösterilmiştir. VanB sınıfı suşlardaki regülatör sistem teikoplanin ile indüklenmeye duyarsızdır. Teikoplanin *vanA*-ilişkili protein sentezini indükler fakat *vanB* ilişkili protein sentezini indüklemeyebilir. Diğer yandan vankomisin her iki sistemde direnç proteinleri sentezini indükler. Şayet *vanB* gen kümesindeki teikoplanine duyarlı enterokoklar önceden vankomisine maruz kalırsa, teikoplanin direnci gelişebilir⁵.

2.4.2.8.2.3. VanC glikopeptit direnci

E.gallinorum'un VanC-ligazı, D-Ala-D-serin ile sonlanan pentapeptidin oluşumunu sağlar. D-Ala yerine D-serin'in girişi, vankomisine affiniteyi azaltır. Peptidoglikan yapıda D-Ala-D-Serin'in D-Ala-D-Alanin'e oranındaki farklılık, VanC fenotipi taşıyan VRE izolatları arasındaki vankomisin direnci farklılığına yol açar. D-Ala-D-Ala'nın yüksek oranda olması, daha düşük MİK değerlerini, D-Ala-D-Serin oranının daha yüksek olması da daha yüksek MİK değerini açıklayabilir. VanC tipi dirence sahip suşlar teikoplanine duyarlıdır. VanC tipi direnç yapısaldır, indüklenemez ve transfer edilemez. *E.gallinorum*, *E.casseliflavus* ve *E.flavescens*'te vankomisine

düşük düzeyde direnç tipiktir. *E.flavescens*'in enterokokal türler arasında olup olmadığı hakkında bazı anlaşmazlıklar olmasına rağmen; *E.gallinorum*'da *vanC-1* geni, *E.casseliflavus*'ta *vanC-2* ve *E.flavescens*'te *vanC-3* geni nükleotid dizileri bildirilmiştir^{5, 43, 47, 50}.

2.4.2.8.2.4. VanD glikopeptit direnci

İlk kez 1991 yılında New York hastanesinde bir *E. faecium* izolatında *vanD* olarak tanımlanan yeni bir vankomisin direnç geni tanımlanmıştır. Bu suşlar 64-256 µg/ml vankomisin ve 4-32 µg/ml teikoplanin ile inhibe edilmiştir. Bu genin; *vanA* ve *vanB* ligaz genlerine % 67 oranında benzerlik gösterdiği, kromozomda yerleştiği ve konjugasyonla diğer enterokoklara transfer edilemediği anlaşılmıştır. Ancak VanD suslarında D,D dipeptidaz aktivitesi belirlenmemiştir ve karboksiptidaz aktivitesi ise düşük düzeydedir. D,D-dipeptidaz aktivitesi bulunmamasına rağmen *vanD* gen kümesi *vanX_D*, *vanR_D*, *vanS_D*, *vanH_D* genlerini içermektedir^{5, 43}.

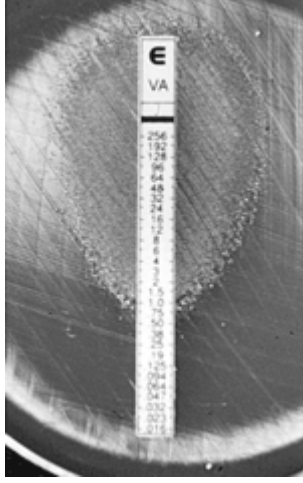
2.4.2.8.2.5. VanE glikopeptit direnci

VanE vankomisin direnç geni, vankomisine düşük seviyede dirençli (MİK 16 mg/ml) ve teikoplanine duyarlı (MİK 0.5mg/ml) *E.faecalis* BM4405 suşunda tanımlanmıştır. Bu yeni direnç fenotipi intrinsik VanC tipi dirence benzer. Aminoasit dizisi VanC'ye %55, VanA'ya %45, VanB'ye %43 ve VanD'ye %44 oranında benzemektedir. Ancak VanE tipi direncin genetik belirleyicisi farklıdır ve interensek bir direnç tipi değildir. *vanE* geni kromozomda yerleşmiştir ve transfer edilemez^{5, 43, 47}.

2.4.2.8.2.6. VanG glikopeptit direnci

Bu direnç tipi *E. faecalis* WCH9 susunda tanımlanmıştır. Bu suş vankomisine düşük düzeyde (MİK=16µg/ml) dirençli, teikoplanine duyarlıdır (MİK=0,5 µg/ml). Bu direnç tipi transfer edilemez. *vanG* gen kümesinin ürünü diğer *van* genlerinin ürünlerine %50 den daha az amino asit dizilim benzerliği göstermektedir^{5, 43, 47}.

2.4.2.8.2.7 Vankomisin bağımlı enterokoklar (VDE)



Şekil 6: Vankomisin bağımlı enterokok

VanA ve VanB tipi VRE lerin bazı suşlarında oluşan ilginç bir fenomen vankomisin bağımlılığıdır. Bu enterokoklar üremeleri için vankomisine ihtiyaç duyarlar. VDE'ler, *Campylobacter* veya gonokokların izolasyonunda kullanılan vankomisin içeren agara ekilen klinik örneklerden elde edilmiştir. Bu izolatlarda doğal ligaz (*ddl*) genlerinde mutasyon sonucu D-Ala-D-Ala'nın normal üretimini sonlandırır ve sonra yedek bir dipeptit benzeri yapı varsa üreyebilir. VanA ve VanB tipi enterokokların çoğunda yalnızca vankomisin varlığında ortaya çıkar, vankomisin D-Ala-D-Laktat oluşumunda rol alan dehidrogenaz (VanH) ve ligaz (VanA veya VanB) sentezini indükler ve oluşan D-Ala-D-Laktat hücre duvarı sentezinde kullanılır.

Vankomisin uzaklaştırıldığında D-Ala-D-Laktat daha fazla sentezlenmez ve D-Ala-D-Ala veya D-Ala-D-Laktat olmadan hücre çoğalmaya devam edemez^{5,51}.

Vankomisin bağımlı enterokoklar ilk kez 1993 te, VRE ile kolonize olan, vankomisin ile tedavi edilen bir hastanın idrar örneğinden izole edilmiştir⁵². Sonraları VD *E.faecalis* ve *E.faecium* çeşitli vücut bölgelerinden izole edilmiştir. Bu vakaların ortak özelliği vankomisin veya geniş spektrumlu bir antibiyotik kullanma öyküsüdür^{51,52}.

Vankomisin bağımsızlığına geri dönüş de incelenmiş, dönüşümün muhtemelen ya D-Ala-D-laktat konstitütif üretimine yol açan bir mutasyon veya D-Ala-D-Ala sentezini eski haline getiren bir mutasyon ile ortaya çıktığı kanaatine varılmıştır. VDE'lerin VRE'ye benzer pulsed field jel elektroforez kalıplarına sahip olduğu bulunmuştur^{5,51}.

2.5. Kolonizasyon, ve Risk Faktörler

Vankomisin dirençli enterokok kolonizasyonu, herhangi bir enfeksiyon semptomu veya klinik bulgusu olmaksızın VRE kültür pozitifliği olarak tanımlanabilir. Kolonizasyon bölgesi sıklıkla intestinal ve alt üriner sistemdir. Hiçbir semptoma yol açmayan kolonizasyon uzun süre devam edebilir ve diğer hastalara ekzojen kökenli VRE geçişi için bir kaynak oluşturabilir. Ekzojen kökenli kolonizasyon için hastanede kalış süresi önemli bir risk faktörüdür. Bu sürede kolonize hastaların çıkartıları ile direkt veya hastane personelinin kontamine elleri ile indirekt olarak kontamine olmuş; hastaya direkt uygulanan elektrokardiyografik monitor, ventilatör tüpü, pompalar, glukozmetre, termometre, tansiyon aleti, steteskop gibi non-invazif, intravenöz kateterler, fleksible skoplar gibi invazif enstrumanlarla, telefon, anahtar, kapı, kapı kolu, pencere, yer döşemesi, yatak başlıkları, hasta yatağı, çarşaf, karyola demiri ve komidin gibi hasta ile indirekt ilişkili olan malzemeler ile temasa bağlı olarak kolonizasyon riski artar. Nitekim bu malzemelerin üzerinde VRE'nin 3-15 gün enfeksiyon yeteneğini sürdürdüğü gösterilmiştir. İshalli kolonize hastaların bulunduğu hasta odasındaki kontaminasyonun daha yoğun olduğu belirtilmektedir⁵³. Hastalardaki ekzojen kökenli VRE kolonizasyonu, hastaneden çıkıştan sonraki aylar içinde de devam edebilir.^{5,53}.

Ekzojen temasın prognozu ve kolonizasyon risk oranı, VRE ile maruziyete, maruziyetin süresine, konağın duyarlılığına ve maruz kalınan VRE miktarı ile virulans ve kolonizasyon faktörlerinin mevcudiyetine bağlı olarak değişir. VRE ile endojen kökenli enfeksiyonlar karakteristik olarak mikroorganizmanın intestinal sistemden translokasyonu sonucu oluşur. Bu sebeple yüksek riskli birimlerde aktif sürveyans kültürleri ile VRE kolonizasyonunun takibi endojen ve eksojen kaynaklı enfeksiyonların kontrolü için önemlidir. Bir serviste yatan hastalar arasında VRE ile kolonizasyon oranı %50 den yüksekse, kolonizasyon ve enfeksiyon için diğer risk faktörleri daha az önemli olmaktadır^{53,57}.

Vankomisin dirençli enterokok kolonizasyonunda hastaya ait faktörler de önemlidir. Altta yatan ciddi kronik hastalığı olan ve uzun süreli ve geniş spektrumlu antimikrobiyal ilaç kullananlar, solid organ transplantasyonu yapılanlar veya hematoloji hastaları, VRE kolonizasyonu için yüksek risk oluşturur.

Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, intestinal florada duyarlı bakterilerin eliminasyonuna yol açarak VRE gibi dirençli bakterilerin kolonizasyonuna ve aşırı

çoğalmasına yol açar. Flora bakterilerinin bakteriosinlerin yanı sıra, yabancı bakterilerin yaşamını kısıtlayan buna karşılık sIgA gibi savunma faktörlerinin ömrünü uzatan polyaminler gibi proteinlerin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bakteriyel flajellinler, barsak epitel hücreleri ve Paneth hücrelerince salgılanan ve Gram pozitif bakterilere bakterisid etki gösteren bir lektin olan RegIII γ ekspresyonunu stimüle ederler. RegIII γ ekspresyonu, intestinal epitelde Toll like reseptör-Myeloid diferansiyasyon faktör 88 (TLR-MyD88) yolağının flora bakterilerince direkt veya indirekt olarak uyarılması ile gerçekleşir. RegIII γ indüksiyonu hemopoetik hücrelerde TLR-5 ekspresyonunu gerektirir ve bu da IL-22 ekspresyonuna bağlıdır^{63,64}. Metronidazol, neomisin ve vankomisin (MNV) kombinasyonu ile tedavi edilmiş farelerin barsaklarında RegIII γ seviyesinin azaldığı ve bunun da VRE kolonizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. MNV alan fareler oral olarak VRE ile infekte edildiğinde, 24 saat sonrasında kan dolaşımına geçtiği de bildirilmiştir. Bu farelerde sistemik flajellin uygulaması sonrası VRE kolonizasyonu dramatik olarak azalmıştır^{63,64}.

Genellikle uzun süreli bakım ünitelerinde kalan hastalar, sağlık çalışanları ve bunların ev halkı da VRE enfeksiyonları için riskli gruplardır. Cerrahi reeksplorasyon ihtiyacı, servisler arası nakil, enteral beslenme, sükralfat kullanımı, VRE ile kontamine tıbbi aletlerle maruziyet, VRE vakasının yakınında izleniyor olmak ve VRE vakasına bakım hizmeti veren aynı sağlık personeli tarafından bakım hizmeti almak VRE ile kolonizasyon veya enfeksiyon için tanımlanmış risk faktörlerdir. Oral vankomisin kullanımı da VRE kolonizasyonu için risk faktörü olduğundan antibiyotik ilişkili ishal tedavisinde oral vankomisinden kaçınılması önerilmektedir^{5,53}.

Enterokokal enfeksiyonlar her iki cinsten eşit olarak görülmektedir. Üriner enfeksiyonlar kadınlarda daha sık olmasına rağmen, enterokoklar komplike olmayan sistitlerin nadir nedenidir. Enterokokal endokarditler ise erkeklerde daha fazla görülür³⁴. Yaşlı hastalarda enterokokal enfeksiyonlar ve kolonizasyon, bu grupta diyabet, romatizmal hastalıklar, barsak florasında bozukluklar gibi kronik hastalıkların yanı sıra, üriner kateterizasyon, divertikülit veya safra yolları hastalıkları nedeniyle batin cerrahisi gibi hastalıklar daha sık görüldüğü için, daha yüksek sıklıkta görülür.

Yenidoğanda ise enterokoklar, bakteriyemi ve menenjitte sebep olurlar. Enterokok salgınları daha çok, yenidoğan, yoğun bakım, çocuk yoğun bakım ve hematoloji-onkoloji

unitelerinde ortaya çıkmaktadır. Ancak her şeye rağmen VRE enfeksiyonları pediatrik hastalarda daha az görülmektedir⁶⁷.

Özetle VRE ile oluşan hastane kaynaklı enfeksiyonları için risk faktörleri:

1.Demografik risk faktörleri:

- Hastanede veya Yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatış süresi,
- VRE ile kolonize ya da infekte hastanın yakınında bulunulması ve VRE ile kolonize hastaya bakım veren bir hemşireden bakım alınması,
- Hastane içinde bir servisten diğerine transfer edilmesi,
- VRE ile kontamine olmuş tıbbi aletlere maruz kalınması,

2.Altta yatan hastalığın ağırlığı ile ilgili risk faktörleri:

- Yüksek APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation scoring system) skoru,
- Böbrek yetmezliği,
- Yakın zamanda ameliyat geçirme,
- *C.difficile*'e bağlı kolit,
- Hepatobiliyer hastalık,
- İmmüsupresyon veya organ alıcısı olmak,
- Enteral beslenme,

3.Antimikrobiklerle ilgili risk faktörleri:

- Antibiyotik tedavisinin süresi ve miktarı
- Vankomisin, 3.kuşak sefalosporin, anti-anaerob antibiyotik, kinolon, aztreonam gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı
- Operasyon öncesi barsak boşaltılması hazırlığı şeklinde sınıflandırılabilir.

2.6. Enterokok enfeksiyonlarının epidemiyolojisi

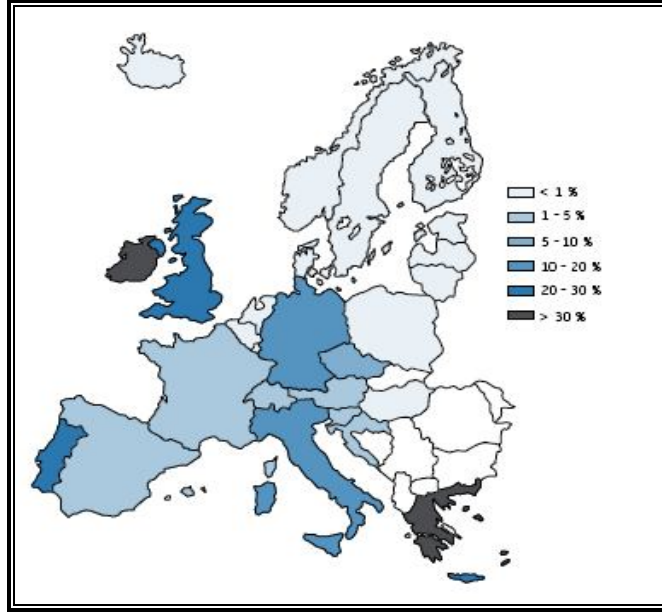
Enterokoklar son yıllarda tüm dünyada giderek artan sıklıkta yol açtıkları hastane enfeksiyonu salgınları ile dikkatleri üzerilerine çekmişlerdir. İlk yapılan epidemiyolojik izlem çalışmaları, enterokokların hastadan hastaya ve hatta hastaneler arası yayılabilmesinde bu bakterilerin normal barsak florasında bulunmasının temel risk faktörü olduğunu, bu sebeple de insan dışkılarından en çok izole edilen tip olan *E.faecalis*'in hastane enfeksiyonlarında % 85-95'lik oran ile en yüksek insidansa sahip olan tür olduğunu, bunu barsak florasında ikinci sıklıkta görülen *E.faecium*'un % 5-10 oranı ile izlediğini göstermiştir^{5,53}. Ancak İngiltere'den Uttley ve arkadaşları ile Fransa'dan Leclercq R arkadaşları tarafından 1986 yılında eş zamanlı olarak vankomisin dirençli enterokokların sebep oldukları enfeksiyonların kliniğine ait ilk bilgiler açıklanması ve direnç özellikleri tespit edildikten sonra 1988 yılında yayınlamalarından sonra enterokoklara bağlı hastane enfeksiyonları epidemiyolojisinde 2 önemli değişiklik yaşanmıştır^{55,56}. Bunlar insidans da ki hızlı artış ve tür dağılımındaki değişimdir. Özellikle Vankomisin'in hastanelerde yaygın olarak kullanılmaya başlandığı 1989 yılından itibaren, Avrupa ülkeleri ve ABD'den başta glikopeptid grubu antibiyotikler olmak üzere beta-laktam ve aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı dirençli çok sayıda klinik izolat ve vaka bildirimi yapılmış, VRE'lerin özellikle *E.faecium*'un klonal seleksiyona uğrayarak hastane ortamına hakim olduğu, ya tek başlarına veya stafilokoklarla birlikte hastane enfeksiyonlarındaki insidanslarını hızla artırdıkları tespit edilmiştir.⁵

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1990 -1992 yılları arasında, hastane enfeksiyonları içerisinde enterokokların, *E.coli* ve Stafilokoklardan sonra yaklaşık olarak % 10'luk bir insidans ile üçüncü sıklık da yer aldığını bildirilmiştir^{6,9}. Farklı hastanelerde yapılan çalışmaların sonuçlarının açıklandığı bildiride, enterokokların hastane kökenli bakteriyemilerin %9'u, cerrahi yara enfeksiyonlarının % 13'ü, üriner sistem enfeksiyonlarının %12 -16 sıdandan sorumlu olduklarını, enfeksiyonların % 60'dan fazlasının da eksojen kaynaklı olduğunu ve yarısından fazlasının da yoğun bakım ünitelerinde görüldüğünü belirtilmiştir^{5,6}.

Diğer taraftan ABD'den Ulusal Hastane enfeksiyonları Sürveyans Birimi-NNIS-nin verilerinde; hastanelerde 1989 -1997 yılları arasındaki peryotta VRE izolasyon oranlarının; yoğun bakım ünitelerinde görülen hastane enfeksiyonlarında %0.4 ten %23.2'ye, diğer ünitelerde ise %0.3'ten %15.4'e yükseldiği bildirilmiştir¹²⁰. Aynı

birimin 1998 yılı raporunda ise, yoğun bakım servislerinde görülen hastane enfeksiyonlarında % 22,6 olan VRE insidansının, 1999 yılında %25'e ve 2003 yılında da %28,5'e yükseldiği gösterilmiştir. Bu bildirimler dışında genel olarak ABD'de 2000'li yılların başlarında hastane enfeksiyonlarında VRE insidansının %25'in üzerine çıktığı, hastanede yatan hastalarda VRE kolonizasyon oranının da % 5-18 arasında değiştiği, ancak hastane dışındaki popülasyonda intestinal kolonizasyon olmadığı bildirilmiştir^{122,123}. Benzer şekilde Kanada'dan bildirilen 7 yıllık VRE sürveyans raporuna göre; 2001-2003 yıllarında %0,5 olan enterokok izolatları arasında VRE sıklığı, 2006 yılında %3,3'e çıkmıştır¹²⁶.

Avrupa'da da hastane enfeksiyonlarında, VRE epidemiyolojisinde, ABD'den küçük nüans farkları olmakla beraber benzer artış trendi yaşanmıştır. European Antimicrobial Surveillance System(EARSS)'inin 1998 verilerine göre bakteriyemiye sebep olan *E.faecium* izolatları arasında en yüksek vankomisin direnç oranı İngiltere'de %24 ve İtalya'da ise %10 olarak belirlenmiştir. Ancak aynı sistemin 2007 verilerine göre en düşük VRE insidansı İskandinav ülkelerinde %1 olarak verilirken, Yunanistan ve Portekiz gibi Güney Avrupa ülkelerinde VRE oranının %45'in üzerine çıktığı belirtilmiştir. Almanya'da EARSS verilerine göre 2001'de VR *E.faecium* oranı %1 iken, 2007 yılında bu oran %15'e çıkmış ancak VR *E.faecalis*'lerde bu oran %1'in altında kalmıştır. Fransa'da 2005 yılında GR *E. faecium* oranı %5 olarak bildirilmiştir. İngiltere'de ise 2007 yılında enterokokların sebep olduğu bakteriyemilerde VRE oranı %8,5-12,5 arasında bulunmuştur. Bu oran *E.faecium* için %20-25, *E.faecalis* için %1,6-2,5'tir. İrlanda'da VR *E.faecium* oranı 2005 yılında %30-35 olarak bildirilmekteyken, VR *E.faecalis*'lerde ise bu oran %5'in altında bulunmuştur. İtalya'da ise 1995 yılında VR *E.faecium* oranı %9 iken, 2001'de %15'e, 2003'de %24'e çıkmış, 2007 yılında ise %11 olarak bildirilmiştir. *E.faecalis* 'lerde ise %5'in altındadır¹⁴³ (Şekil 7).



Şekil 7. Avrupa’da VR *E.faecium* prevalansı (2007)

Türkiye’ de ilk vankomisin dirençli *E. faecium* suşu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi’nden Vural ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Bu suş malign histiyositozis tanısı almış, bronkopulmoner enfeksiyonu olan bir bebekte plevra sıvısından izole edilmiştir. Bunu aynı yıl içerisinde diğer merkezlerden yapılan bildirimler takip etmiştir⁶¹.

CDC’nin alt komitesi olan “Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)” 1995 yılı ortalarında VRE’lerin hızlı yükselişini önlemek ve kontrol altına almak üzere bir ek rehber yayınlamak zorunda kalmıştır (Appendix G). Buna rağmen VRE’lerde artış trendi sürmüştür, insidans oranındaki artış mortalite oranlarına da yansımış ve VRE’ye bağlı enfeksiyonların mortalitesi VSE’lara bağlı enfeksiyonlara göre 2 kat artarak %36’lara kadar yükselmiştir^{5,58}.

Enterokok kökenli hastane enfeksiyonlarının insidansında görülen dramatik artışlarda, hastanelerde üretilen hizmetin kalitesi ve bağlı olarak yatış endikasyonu alan hastaların özelliklerinin de etkili olduğu gösterilmiştir. Altta yatan ciddi bir hastalığı olan veya immunsuprese hastalar, kanser kemoterapisi alanlar veya transplantasyon hastaları, intra abdominal veya kardiyotorasik cerrahi uygulanan hastalar veya vankomisin, III. kuşak sefalosporinler, karbapenemler ve 5-nitroimidazol türevleri gibi geniş spektrumlu antimikrobiyal kullanım zorunluluğu olan hastaların kabul edildiği, komplike tanı ve tedavi

girişimlerinin uygulandığı hastanelerde enterokok enfeksiyonlarının insidansı küçük ve orta ölçekli şehir hastanelerine oranla oldukça yüksektir. Mesela transplantasyon için bekleyen hastalarda endojen florada VRE taşıyıcılık oranı % 3.4 iken; transplantasyon sonrası hastalardaki VRE oranının % 44'e çıktığı bildirilmiştir⁵⁹.

Hastanelerde el yıkama alışkanlığının ve diğer enfeksiyon kontrol önlemlerinin istenen seviyeye çıkarılamaması, kolonizasyon ve irrasyonel antibiyotik kullanımının kontrol altına alınamaması glikopeptid dirençli enterokokların hastane enfeksiyonlarındaki artışını sürdürmesine yol açacaktır. Ancak VRE veya GRE (glikopeptid resistan enterokok) insidansındaki artışın bir diğer önemli sebebi, Avrupa'da kümes hayvanlarının rasyonlarına gelişim faktörü olarak eklenen avoparcin gibi glikopeptit türü antibiyotiklerdir. Avrupa ülkelerinin çoğunda çiftlik hayvanları, tavuk cesetleri, diğer et ürünleri ve atık su örneklerinde *VanA* tipi VRE ciddi problem haline gelmiştir. Bu zengin rezervuar çeşitliliği gıda zinciri ile insanlara da yansımış ve toplumda VRE kolonizasyon oranı %2-12 olarak bulunmuştur. Ancak 1994 yılından itibaren bir çok ülkede avoparcin kullanımının yasaklanması ve hastalarda glikopeptit grubu antibiyotiklerin kısıtlı kullanımı sonucu bu ülkelerden bildirilen VRE oranlarında azalma tespit edildiği bildirilmiştir.^{60,124}.

Diğer taraftan *VanA* tipi transposon *Tn-1546* ile kodlanan direnç hayvanlar arasında VRE'nin klonal gelişimini hızlandırmış ve sonuçta VRE'ler gıda zinciri ile insana bulaşarak gastrointestinal kolonizasyonu artırmışlardır.

ABD'de 1997 yılına kadar kümes hayvanları ve herhangi bir hastane yatış öyküsü olmayan kişilerde yüksek düzey dirençli (MİK>32 mg/L) VRE tespit edilmemiştir. Oysa Almanya'da, 1994 yılında, sağlıklı insanların % 12 sinde VRE taşıyıcılığı bulunmuştur⁵⁷. Bu farkın ABD'de hayvan yemlerinde glikopeptit grubu antibiyotik kullanılmamasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu sebeplere dayanarak ABD'de VRE kökenli hastane enfeksiyonlarında en önemli rezervuarın endojen florasında kolonizasyonu olan hastalar olduğu tespit edilmiş ve VRE ile kolonize hastaların takip amaçlı kültürlerle izlemleri önerilmiştir^{57,60}. Ancak ABD'de hastanelerde glikopeptid türevi antibiyotiklerin kullanımının daha fazla olması sebebi ile, VRE'lerin hastane enfeksiyonlarındaki insidansları Avrupa ülkelerine göre oldukça yüksek bulunmuştur.

2.7. Enterokokal Enfeksiyonlar

Vankomisin dirençli enterokok enfeksiyonu, lokalizasyon ile ilişkili semptom veya klinik bulguların eşlik ettiği pozitif VRE kültürünün varlığı olarak tanımlanabilir. Klinik örneklerden izole edilen suşların %80-90 ını *E.faecalis*, %5-10 kadarını ise *E.faecium* oluşturur. Son yıllarda çoklu ilaç direnci gösteren *E.faecium* suşlarının hastane enfeksiyonlarında artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca nadir olarak *E.durans*, *E.casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E.gallinorum*, *E.mundtii*, *E.flavescens*, *E.avium* ve *E.hirae* gibi diğer enterokok türleri hastane enfeksiyonlarda klinik materyalden izole edilirken *E.malodoratus*, *E.pseudoavium* ve *E.sulfureus* türleri ile PYR testi negatif olan ve atipik enterokoklar olarak adlandırılan *E.columbae*, *E.cecorum* ve *E.saccharolyticus* türleri henüz insanlardan izole edilmemiştir⁶⁶.

Enterokoklar İle Gelişen Hastane İnfeksiyonları: Hastanede yatan hastalarda, endojen kökenli veya ekzojen kökenli hastane enfeksiyonları ortaya çıkar. İnfekte hastaların çıkartılarıyla geniş bir alanı enfekte eden enterokoklar, duyarlı hastalarda idrar yolları, kan, BOS gibi steril vücut bölgelerine yerleşerek, üriner sistem enfeksiyonları, endokardit, sepsis veya bakteriyemi, intra-abdominal enfeksiyonlar, pelvik enfeksiyonlar, menenjit ve cerrahi yara enfeksiyonlarına yol açabildikleri gösterilmiştir.

1- Üriner sistem enfeksiyonları

Enterokokların sebep olduğu enfeksiyonların en sık görülen tipidir ve çoğu nozokomiyal kaynaklıdır. Üriner sistemde hastane kökenli VRE enfeksiyonları; sistit, piyelonefrit, prostatit ve perinefritik apse gibi klinik tablolarla seyredebilir. Üriner kateterizasyon en sık görülen risk faktörü olmakla beraber, üriner sistem anomalileri, cerrahi girişim ve antibiyotik kullanımında enterokokal risk faktörleri arasında yer alır. Toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarında, sağlıklı kadınlarda % 5'inden azında enterokok izole edilmektedir^{53,58,62}.

2- Endokardit

Enterokoklar infektif endokarditlerin *S.viridans* ve *S.aureus*'dan sonra en sık rastlanılan üçüncü önemli etkenidir. Bakteriyel endokarditlerin % 5-15'inde enterokoklar etkindir ve en sık *E.faecalis* görülür. Hastalık cerrahi yolla veya çeşitli manipulasyonlarla bakterinin gastro-intestinal sistemden veya çoğunlukla genitoüriner sistemden translokasyonu ile endojen kaynaklı subakut endokardit şeklinde başlar. Ayrıca intravenöz ilaç bağımlılarında da %5-53 oranında enterokokal endokardit görülebilir. Vakaların

çoğunda altta yatan bir kapak hastalığı veya prostetik kapak bulunmakla beraber, enterokoklar normal kapaklarda da enfeksiyon oluşturabilir⁶².

3- Bakteriyemi

Enterokokal bakteriyemi, endokarditlerden daha sık görülen bir klinik formdur. Hastane enfeksiyonları içerisinde giderek artan öneme sahip olan VRE bakteriyemileri, hastane kökenli tüm bakteriyemiler içerisinde Avrupa'da 4. ABD'de ise 3. sıklıkta görülmektedir. VRE bakteriyemisi için risk faktörler, hemodiyaliz, organ transplantasyonu, kortikosteroid kullanımı, kemoterapi veya parenteral beslenme, cerrahi girişimler, ciddi hastalıklar, uzun süreli antibiyotik kullanımı, üriner kateterler, nötropeni ve mukozittir. Enfeksiyonlar sıklıkla nozokomiyal kaynaklıdır. Olguların %21-45'i polimikrobiyal olan bakteriyemiler de primer lokalizasyon sıklıkla üriner sistem veya karın içi enfeksiyonlardır. Ancak, pelvik enfeksiyonlar, termal yanık, dekübitis ülserleri ve diyabetik ayak gibi yaralar, arteriyel veya venöz kateterler ve kolanjit VRE'nin dolaşıma katılımını sağlayan diğer giriş yollarını oluştururlar^{34, 62}.

Vankomisin dirençli enterokok bakteriyemisi olan hastalardaki mortalite oranı, popülasyona bağlı olarak değişir. Otolog stem cell transplantasyonu yapılanlarda mortalite oranı %10 kadar düşük olmasına karşın, endokarditli hastalarda mortalite oranı % 30 dan, solid organ tümörü olanlarda %50'den, ciddi hastalığı olanlar ve karaciğer transplant hastalarında %70 den fazladır⁶².

4- Karın içi ve pelvik enfeksiyonlar

Enterokoklar karın içi ve pelvik enfeksiyonlarda sıklıkla aerop ve anaerop mikroorganizmalarla beraber bulunur. Ancak bu enfeksiyonlarda enterokoklar sıklıkla göz ardı edilmekte ve hastalara enterokoklara etkisi olmayan antimikrobiyal tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Enterokoklar, nefrotik sendrom veya sirozlu hastalarda gelişen spontan peritonit ve periton dializi uygulanan vakalarda gelişen abdominal enfeksiyon veya intra-abdominal abselerde tek mikroorganizma olarak izole edilebilmektir. Ayrıca salpenjit, endometrit gibi peripartum maternal enfeksiyonlar ve sezeryan sonrası apselerde de etken olabildikleri gösterilmiştir⁶².

5- Yara ve yumuşak doku enfeksiyonları

Enterokoklar nadiren selülit veya derin doku enfeksiyonlarına yol açarlar. Cerrahi yara enfeksiyonları, dekübitis ülserleri ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında diğer bakteriler ile birlikte izole edilebilirler⁶².

6- Menenjit

Enterokokal menenjit nadiren görülür ve genellikle santral sinir sisteminde anatomik bir defekt, geçirilmiş beyin ameliyatları veya kafa travması veya ventrikülo-peritoneal şant gibi predispozan faktörlerin varlığında ortaya çıkabilir. Ayrıca bakteriyemiler, AIDS ve akut lösemi gibi immünsüprese hastalarda da VRE menenjiti görülebilir. Etken diğer enterokok enfeksiyonlarında olduğu gibi sıklıkla *E. faecalis* olup daha seyrek olmak üzere *E. faecium*'dur^{62,69}.

7- Neonatal enfeksiyonlar

Enterokoklar yenidoğan için de önemli bir patojendir. Yenidoğanlarda erken ve geç sepsise neden olur. Enfeksiyonların %77'den fazlası kateteri olan yenidoğan bebeklerde görülür. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde VRE'nin neden olduğu enfeksiyonlara bağlı nozokomiyal salgınlar bildirilmektedir. Enterokokkal suşların %82'si *E. faecalis*, %14'ü *E. faecium* olarak tespit edilmiştir. Enterokoklara bağlı üriner sistem enfeksiyonlarına yenidoğanlarda nadiren rastlanır⁶⁸.

2.8. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri

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

olmaları nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda kullanımları sınırlıdır. Son yıllarda geliştirilen moleküler tekniklerle beraber fenotipik yöntemlerin kullanımı yararlı bilgiler sağlayabilmektedir^{70,71}.

Enterokokların ayırımında oldukça başarılı olan çeşitli moleküler tekniklerin gelişimi, epidemiyolojik yönden önemli bir anlayış getirmiştir. Ayırım gücü daha yüksek tiplendirme tekniklerinin kullanımı sonucu, hastalar arasında direkt ve indirekt temas ile eksojen olarak kazanılabilen suşların ayırımı mümkün olmaktadır. Dirençli enterokokların hastane içinde ve hastaneler arası yayılım gösterdiği de bildirilmektedir. Kullanılan ilk moleküler teknikler, plazmid profil analizi ve restriksiyon enzim analizi (REA)dir⁷⁰. Bu teknikler bazı durumlarda faydalı olabilmektedir, fakat kullanımlarında bazı problemler vardır. PFGE ile DNA restriksiyon endonükleaz profilinin belirlenmesi, enterokokal suşların ayırt edilmesinde olağanüstü yararlar sağlamaktadır. Multilokus Enzim Elektroförez (MLEE), ribotiplendirme ve RAPD-PCR veya REP-PCR gibi PCR'a dayalı tiplendirme metotları da enterokok suşları arasındaki genetik ilişkinin araştırılmasında kullanılmaktadır. PCR ürünlerinin dizilenmesi veya Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP) ile incelenmesi de enterokoklardaki spesifik direnç genleri arasındaki farklılıkları göstermede ve izlemede kullanılabilen yöntemlerdir. Pek çok araştırmanın sonuçlarına göre; genomik DNA'nın SmaI enzimi ile kesildiği PFGE, suşların ayırımında belirgin avantajlar sağlayan oldukça yararlı bir yöntemdir. Halen PFGE en yararlı ve en güvenilir tek tiplendirme metodudur ve enterokokal enfeksiyonların epidemiyolojik incelenmesinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir^{3,10,11,12,70,71}. Enterokokların PFGE ile incelenmesinde çeşitli protokoller yayınlanmış olmasına rağmen, laboratuvarlar arası karşılaştırma yapabilmek için standardize protokol gelişimine ihtiyaç vardır. PFGE diğer metotlardan daha diskriminatif olmasına rağmen, PFGE profillerinin epidemiyolojik olarak yorumlanması her zaman kesin değildir. Genetik değişikliklerin ortaya çıkışı ile ilişkili olarak PFGE profilinde farklılıklar elde edilir ve bu da klonalite değerlendirilmesinde problemlere yol açar. Bazı vakalarda polimorfizm seviyesini tanımlamak güç olduğundan, daha uygun yorumlama tartışmalı bir konu olarak kalmaktadır.

Sonuç olarak enterokoklar için eksiksiz, tek bir tiplendirme tekniği yoktur; özellikle genomik polimorfizme dayalı çeşitli tiplendirme tekniklerinin sonuçlarının birleştirilmesi yakın ilişkinin göstergesi olarak kullanılabilir. Epidemiyolojik yorumların

aydınlatılmasına yardımcı olmak için, farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak veya ek bir tipleme tekniği ile beraber yapılan PFGE kullanımı önerilmektedir. Moleküler tipleme bilgilerinin yorumlanmasındaki genel prensip, PFGE profilindeki bant farklılıklarının incelenmesidir^{70,71}.

2.8.1-Fenotipik tipleme metotları

2.8.1.1-Biyotipleme

Biyotipleme mikroorganizmanın metabolik ve fizyolojik karakterlerini baz alır. Bu bağlamda enerji metabolizması, karbonhidrat kullanımı ve farklı enzimatik aktiviteleri ölçen test yöntemleri kullanılır. Elde edilen bulgular mikroorganizmanın genel morfolojik özellikleri ile birlikte sıklıkla otomatize edilmiş bir nümerik değerlendirme sistemi içerisinde sorgulanır. En çok kullanılan test sistemleri API 20 Strep, Api 50 CH ve Rapid ID 32 Strep'dir. Ayrıca eskulinaz ve piraz aktivitesi Apizym testi ile değerlendirilebilir. PhenePlatek PhP plate (PhPlate Microplate Techniques, Stockholm, Sweden) enterokokların epidemiyolojik özelliklerinin araştırmasında önemlidir ve PFGE ile elde edilen epidemiyolojik gruplar ile benzer gruplar verir⁷⁰.

Bu test sistemlerinin tamamı, sınırlı sayıda enterokok türünü gösterir ve daha ileri seviyede identifikasyon gerektirir. Biyotiplemede yaklaşık olarak bakteriye ait 1600 den fazla özellik test sistemlerinde kullanılabilirse de aslında çoğu enzimatik özelliği tespiti yönelik 6 test ile suşların büyük birçoğunun tanımlanabileceği bildirilmiştir. Facklam and Collins, 1989'da enterokokların 20 temel fenotipik özelliğini baz alan bir identifikasyon sistemi tanımlamışlardır. Manero ve Blanch ise 1999 yılında, 19 enterokok türünün tanımlanması için 12 temel fizyolojik ve biyokimyasal özelliği dikkate alan bir biyokimyasal sistem geliştirmişlerdir. Reed ve arkadaşları da enterokokların hızlı tür identifikasyonu ve vankomisin direncinin gösterilmesinde fenotipleme sistemine dayalı bir algoritma kullanmıştır. Bunun Api20 Strep sisteminden daha güvenilir olduğu sonucuna varmışlardır. Bejuk ve ark. tarafından 2000 yılında bilgisayara dayalı inductive learning by logic minimisation (ILLM) sistemi geliştirilmiş ve bu yöntemle, klinik açıdan önemli olduğu bilinen 12 enterokok türünün tanımlanması mümkün olmuştur⁷². Day ve arkadaşları (2001) sadece dokuz özelliği

sorgulayan test sistemi ile *E.faecalis* ve *E.faecium*'u diğer enterokoklardan ayırılabilirliğini göstermişlerdir^{70,73}.

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

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

Poliakrilamid gelde elde edilen protein profillerinin bakterinin eksprese ettiği proteinler için parmak izi olarak dikkate alındığı bu yöntem diğer sınıflandırma şemaları ile kombine edilerek, bilinmeyen izolatların tanımlanması amacı ile kullanılabilir. Son çalışmalarda elde edilen sonuçlar, mikroorganizmaların protein parmak izi ile DNA-DNA homoloji değerleri arasında yüksek oranda korelasyon olduğunu göstermiştir. Andrighetto ve arkadaşları (2001), İtalyan peynirlerinde enterokok türlerinin identifikasyonunda SDS-PAGE'i referans metod olarak kullanmış ve RAPD-PCR ile uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir⁷⁴. Devriese ve arkadaşları (2002) filogenetik olarak yakın ilişkili *E.durans*, *E.hirae* ve *E.villorum* türlerinin ayrımının genomik metodların yanı sıra SDS-PAGE ile de yapılabilirliğini göstermişlerdir⁷⁵. Klare ve arkadaşları ise, 1993-1995 yılları arasında izole ettikleri glikopeptit dirençli *E.faecium* suşlarında 39 kDa luk bir sitoplazmik proteinin dirençle ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir⁷⁶. Ayrıca enterokoklarda penisilin bağlayan protein (PBP)'lerin SDS-PAGE kalıplarının DNA-DNA hibridizasyon sonuçları ile korele olduğunu göstermişlerdir. Bu kalıpların, yeni türlerin tanınması ve tür ayırımında kesin bir metot olarak dikkate alınabilirliğini vurgulamışlardır⁷⁰.

2.8.1.3. Multi-Lokus Enzim Elektroforezi (MLEE)

Multilokus enzim elektroforezis yöntemi, ökaryotik canlıların populasyon genetiği ve sınıflandırılmasında uzun bir süreden beri kullanılmakta olan standardize edilmiş bir metoddur. Son 20 yıldır da giderek artan yoğunlukta bakteriyel evrim ve sınıflandırmanın anlaşılabilmesi için kullanılmaya başlamıştır. MLEE'nin sınıflandırma ve epidemiyolojik ilişkiyi tespitiye yönelik diğer fenotipik yöntemlerden farkı, allel profillerinin tamamını elektroforetik tip olarak verebilmesidir. Bu yöntem hücre içi enzimlerin elektroforetik hareket yeteneğine göre karakterize edilmesini esas alır ve organizmaları oluşturdıkları elektromorfo tiplerine göre diğerlerinden ayırır. Bu elektroforetik tiplerden popülasyon karakterizasyonu için objektif bir databaz oluşturulabilir. Genellikle, MLEE ile 20 kadar housekeeping enzimde doğal olarak yüksek değişkenlik gösteren lokuslar hedef alınır, bu sebeple teknik monolokus enzim elektroforezinden çok daha yüksek ayırım gücüne sahiptir^{70, 77}.

Enterokoklar bölünme, çoğalma, enerji transferi gibi hayati fonksiyonları düzenleyen çoğu yapısal işleve sahip 1600'den fazla enzim üretmektedir. Bu izoenzimler farklı katalitik özellik ve bu sebeple farklı elektroforetik hareket yeteneği gösterirler. Enzim çeşitliliği, primer izoenzim ve alloenzimler gibi direkt veya post-translasyonel modifikasyonla oluşan sekonder izoenzimler gibi indirekt genetik faktörlere bağlıdır. İzoenzimler farklı hücre komponentlerinde dağılabilir ve en azından iki farklı gen ile kodlanırlar. Benzer substrat spesifitesi olan enzimleri kodlayan multipl lokuslar gen duplikasyonları oluşumunu sağlar. Nokta mutasyonlarının sonucu olarak, duplike genlerin kodladığı aminoasitlerin kompozisyonu değişir ve elektroforezde farklı hareket yeteneğine sahip enzimler tespit edilir. Elektroforetik hareketteki farklılıklar şarj ve/veya büyüklük farklılığı ile oluşur. Bu enzimler iki yönlü izoelektrofokusun yöntemi ile enterokoklara ait farazi enzimlerin en az %50 si araştırılmıştır⁷⁸.

2.8.1.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

Bu tiplendirme standart bir dizi antibiyotiğe karşı farklı izolatların duyarlılık kalıplarının karşılaştırılması esasına dayanır. Farklı duyarlılık kalıbı veren izolatlar epidemiyolojik köken olarak farklı suşlar olarak kabul edilirler. Farklı hastaların klinik örneklerinden izole edilen suşlar arasında yeni veya alışılmışın dışında bir antibiyotik

duyarlılık kalıbı ile karşılaştırılması halinde o suş yeni bir salgının habercisi olarak değerlendirilir. Bu yöntemle düşük sensitivitede de olsa bütün izolatlar tiplendirilebilir. Yöntem rutin uygulanan bir işleme dayandığı için fazla tecrübeyi gerektirmeyen kolay bir tekniktir. Bu sebeple enterokokların sebep olduğu enfeksiyonların epidemiyolojisinde başarılı bir ayırt edici test sistemi olarak kullanılmıştır. Enterokoklarda, bazı antibiyotiklere karşı görülen intrinsik direncin yanı sıra, konjugatif plazmidlerde veya transpozonlarda kodlanan çok sayıdaki mekanizma ile çok sayıdaki antibiyotiğe karşı direnç görülür. Benzer direnç genlerine sahip enterokok türleri hayvan atıkları, gıda örnekleri ve çevresel örneklerde de görülebildiği için antibiyotik direnç kalıpları, enterokok izolatlarının kaynak tespitinde yani epidemiyolojik izlemde sınırlı öneme sahiptir. Hastane kökenli enterokoklarda, 1980’li yılların sonlarına kadar yüksek düzeyli gentamisin direncinin yanı sıra ampicilin direnci görülürken, son 20 yılda bu gruba % 30’lara ulaşan vankomisin veya glikopeptid direncide eklenmiştir. Enterokok suşlarının antibiyotik kalıplarının çıkartılması bir taraftan düşük ayırım gücüne sahip epidemiyolojik sonuçlar yaratırken, direncin engellenmesi, yeni antibiyotiklere karşı direnç trendinin takibi ve özellikle tedavileri problemlili olan VanC’ye sahip enterokokların izlenmesi açısından önemlidir. Bu tekniğin en belirgin dezavantajı; aynı antibiyotiğe farklı genetik mekanizmalarla direnç geliştiren izolatları birbirinden ayırt edememesidir. Bu epidemiyolojik izlemde ayırım gücünü düşürür. Belirli bir zaman dilimi içerisinde aynı suşun farklı izolatları bir veya birden fazla farklı antibiyotiğe karşı farklı direnç kalıbı verebilirler^{70, 79}.

2.8.1.5. Serotipleme

Enterokoklar opsonizan antikorların hedefi olan kapsüler polisakkarid antijenlere sahiptir. Lancefield R.(1933) streptokokları C polisakkarit antijenlerine göre yaptığı sınıflandırmada, enterokoklarda ortak kapsüler polisakkaridi tanımlayarak, bu grup antijenini D grubu olarak tanımlamıştır. Enterokoklarda kapsüler polisakkarid antijen, 6-alfa-D-glucose-1-2-glycerol-3-PO₄’ın tekrarlayan ünitelerinden oluşan, glycerol-teichoic asit benzeri bir yapı gösterir. Bu yapıda glikoz molekülüne bağlı alfa1,2 ile karbon 2 atomları yer değiştirmiştir. HCl veya formalin ile elde edilmiş kapsül polisakkaritlerine karşı tavşanlardan elde edilen opsonizan antiserumlar kullanılarak

yapılan subtip çalışmalarında iki farklı şemada 24 ve 21 serotip tespit edilmiştir^{81,82}. Ancak Sharpe tarafından yapılan antijenik sınıflandırmada bildirilen serotiplerden sadece 9'unun gerçek enterokok olduğu belirlenmiş ve 21 serotipli şemanın daha gerçekçi olduğu, bu şema ile izolatların %76'nın üzerinde bir oranda tiplendirilebildiği vurgulanmıştır^{80,81,82}.

Enterokokların fenotipik identifikasyonu ve tiplendirilmesinde bu yöntemlerin dışında bir çok araştırmacı tarafından bakterinin, uzun zincirli yağ asitleri, hücre membranı yağ asitlerinin metil ester analizi, enterosin analizi, hücre membranının pyrolizin ekstraksiyonunun mass spektro ile analizi, Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ve Proton manyetik rezonans spektroskopisi (¹H MRS) gibi çeşitli yöntemler denenmiş, sınırlı kullanım alanı bulan bu yöntemlerden bazılarının PFGE'ine yakın ayırım gücü gösterdiği bildirilmiştir⁷⁰.

2.8.2. Genotipik Tipleme Metotları

Enterokok izolatlarının hızlı identifikasyonu ve tiplendirilmesinde, son araştırmalar moleküler biyoloji tekniklere odaklanmıştır. Enterokoklara bağlı salgın epidemiyolojisinde kullanılan moleküler tipleme metotları Willey ve ark tarafından 1994 yılında toparlanmıştır. Kromozomal DNA'nın G+C içeriği ve DNA-DNA hibridizasyon deneyleri gibi bakteri sınıflamasındaki ana teknikler sıklıkla yeni izole edilerek tanımlanan suşların karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Genomda spesifik bölgelerin in-vitro şartlarda amplifikasyonu, amplifiye ürünlerdeki spesifik mutasyonların restriksiyon enzimleri ile kesilerek oluşturdukları bantların polimorfizmi ve nihayet toplam genomun spesifik şartlarda bir restriksiyon enzimi ile hazmı sonunda oluşan bant kalıplarının polimorfizminin analizi enterokokların sebep oldukları salgınların analizinde salgın suşlarının klonal düzeyde tanımlanması için kullanılmıştır.

2.8.2.1. Restriksiyon Enzim Analizi (REA) Bazlı Yöntemler

Enterokokların kromozomal restriksiyon analizinde, mikroorganizmalardan izole edilen DNA uygun restriksiyon enzimlerinden bir veya bir kaç ile kesilmesi sonucu elde edilen DNA fragmanları agaroz jel elektroforezi ile bant büyüklüklerine göre

ayrıştırılır. Elde edilen bant paternlerinin polimorfizmine göre tiplendirme yapılır. Savor ve ark. 1998 yılında klinik örneklerden izole edilen *E.faecium*'ları REA ve PFGE yöntemleri ile incelemiş ancak her iki yönteminde ideal olmadığını bildirmişlerdir⁸³.

2.8.2.1.1. Plazmid DNA profil analizi

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

Donabedian ve arkadaşları (1992) *E.faecium* suşlarının tiplendirilmesinde plazmid analizini plazmid restriksiyon analizi ve PFGE ile beraber kullanmıştır. Plazmid profil analizi ve PFGE kombinasyonu ile, ev yapımı Pecorino Sardo peynirlerinden izole edilen yakın ilişkili suşların tanımlanması mümkün olmuştur⁸⁴.

Son ve arkadaşları (1999) *E.faecium* suşlarının tiplendirmesinde direnç paternleri ve plazmid profil analizinin RAPD-PCR'a komplementer teknik olarak kullanılabileceğini bildirmiştir⁸⁵.

2.8.2.1.2. Pulsed Field Gel elektroforezi (PFGE)

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

yönteminde, elektrik akım yönünün periyodik olarak değiştirilmesi ve geldeki DNA fragmentleri üzerine belirlenen aralıklarla düz akım gönderilebilmesi sonucu, 50kb'dan daha büyük DNA molekülleri bile kolaylıkla ayrıştırılabilmekte ve genomun tamamını değerlendirmek mümkün olmaktadır. PFGE yönteminde bakteriyel enzimlerin spontan degradasyonundan korumak amacı ile agaroz jel içine gömülü haldeki bakteriden, bütünlüğü bozulmadan izole edilen DNA, yine jel içerisinde iken bilinen 5-6 baz uzunluğunda tanıma bölgesine sahip bir restriksiyon enzimi hidrolize uğratarak kesilir. Agaroz jel içerisinde elde edilen DNA fragmentleri akım yönü ve şiddeti belirli aralıklarla değiştirilerek elektroforeze tabii tutulur. Elektroforez sonrası jelin Ethidium bromid ile boyaması sonrası jeldeki DNA fragmentleri UV ışıktaki görüntülenmekte ve elde edilen bant polimorfizmi gözle veya bilgisayar programları kullanılarak değerlendirilmektedir. PFGE ile elde edilen bant paternlerine göre hem kromozomal DNA'nın büyüklüğü tahmin edilebilmekte, hem de suşların klonal olarak ilişkilendirilmeleri mümkün olmaktadır. PFGE oldukça yüksek ayırım gücü olan, sonuçları tekrarlanabilir ve kolay yorumlanabilir bir yöntem olduğu için genotipik identifikasyonda, özellikle hastane enfeksiyonlarının süreyansında referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Yöntemin en önemli dezavantajları pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyması, zaman alıcı oluşu ve hala pek çok tür için standart protokollerin oluşturulamamış olmasıdır^{3, 10, 11, 70, 71}.

Pulsed field jel elektroforez yöntemi hastane kökenli enfeksiyonlardan ve çevresel örneklerden izole edilen VRE / GRE'lerin klonal ilişkilerinin tespitinde de başarı ile kullanılmıştır.

2.8.2.1.3. Ribotipleme

Son yıllarda epidemiyolojik süreyans amacı ile mikroorganizmalarda 16S, 23S ve 5S rRNA genleri arasında bulunan spacer bölgelerdeki heterojeniteyi hedef alan nükleik asit amplifikasyonuna dayalı teknikler denenmiştir. PCR-Ribotipleme yöntemi ile rRNA operonunda cins ve tür düzeyinde farklı büyüklüğe sahip çok sayıdaki spacer bölgeleri hedef alınır. Bu yüzden belirli bir suşta farklı büyüklükte spacer bölgeleri bulunduğundan çok sayıda bant elde edilir. Bu teknik *E. faecium*, Enterobakterler ve *Listeria monocytogenes* izolatlarının tiplemesinde kullanılmaktadır⁷⁰. *E. faecium*

suşlarının PCR-ribotipleme ile analizinin, bu bakteri türünde en az dört sınıf intergenik spacer bulunduğu için, yararlı olmadığı sonucuna varılmıştır⁹⁴.

Ayrıca restriksiyon enzimleri kullanılarak da ribotipleme yapılabilmektedir. Bu yöntemde bakteri kromozomu ekstrakte edilir ve restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi ile ayrılır. Naylon veya nitrosetülöz membrana blotlanan DNA fragmentleri 23S, 16S ve 5S rRNA dizisinin hedef dizilerini tanıyan problarla hibridize edilir. Brisse ve arkadaşları(2002), ribotipleme yöntemini hastane kökenli VRE'lerin klonal ilişkilerini göstermek amacı ile kullanılmış, yöntemin duyarlılığının PFGE ile kıyaslandığında yeterli olduğu, yüksek performans laboratuvarlarında değerli bir primer tipleme tekniği olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu tekniğin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu ve epidemiyolojik olarak önemli genotipleri tanımlayabildiği de gösterilmiştir^{86,87}. Buna karşın Price ve arkadaşları (2002) bu yöntemin VRE çalışmaları için güvenilir olmadığını ileri sürmüştür⁸⁸.

2.8.2.2. Nükleik Asit Amplifikasyonu Bazlı (NAAB) Teknikler

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

2.8.2.2.1 PCR Bazlı teknikler

Bütün mikroorganizmalarda olduğu gibi enterokokların tür, suş ve genotip tayininde başarı ile kullanım alanı bulmuştur. Bu amaçla enterokoklardaki “elongasyon faktör *tuf* geni (EF-Tu) ni hedef alan primerler, cins (Ke et al) (1999) düzeyinde, D-alanin/D-ligaz geni (*ddl*) (Dutka –Malen ve ark) ve *groESL* genini (Teng et al.) hedef alan primerler de tür düzeyinde tanı amacı ile kullanılmıştır⁷⁰. Kniff ve arkadaşları tarafından (2001) *ddl* genini hedef alan tür spesifik primerler *E.durans* ve *E.hirae* için onaylanmıştır⁸⁹. PCR bazlı metodlar antibiyotik direncinin tespiti için de uygulanmış, böylece bir taraftan hızlı duyarlılık testi yapılırken diğer taraftan izole edilen suşlar arasında vertikal yayılan direnç genleri veya gen mutasyonları sebebi ile klonal ilişkide gösterilebilmiştir. Dutka-Malen ve arkadaşları (1995) *ddl* genini hedef alan primerler ile

hem tür düzeyinde tanı hem de glikopeptid direncinin tespitini yapabildiklerini bildirmişlerdir⁹⁰. Miele ve arkadaşları(1995)'da *van* genleri için bir primer seti geliştirmiş, aynı yıl Klare ve ark. (1995) *vanA* genine yönelik PCR yöntemini kullanmıştır. *vanA* ve *vanB* genini hedef alan yeni primerler de geliştirilmiş ve aynı primerler, Del Vecchio ve ark. (1998) tarafından flöresana dayalı PCR sistemi LightCycler'da kullanılmıştır⁷⁰. Daha sonra enterokokların tanısında ve epidemiyolojik sürveyansında kullanılmak üzere, çok sayıdaki araştırmacı tarafından, enterokokların 16S rRNA'sını hedef alan primerlerle tür tayini ile eş zamanlı olarak *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *C2* ve *C3* genlerini alan primerlerin kullanıldığı, glikopeptid direncinin tespitine yönelik multipleks PCR protokolleri geliştirilmiştir^{90,91}. Ayrıca enterokokların virulans genlerini hedef alan PCR teknikleri geliştirilmiştir⁹².

2.8.2.2.2-Random Amplified Polimorphic DNA-PCR(RAPD-PCR)/ Arbitrarily primed-PCR (AP-PCR)

Random primerler kullanılarak DNA polimorfizminin gösterilmesine dayalı metottur. Düşük annealing ısısında, yüksek Mg^{+} konsantrasyonunda random düzenlenmiş kısa primerlerin bakteri DNA'sına rastgele bağlanması ile oluşan primer-DNA hibridlerinin amplifikasyonu sonucu oluşan DNA fragmentlerinin polimorfizmini hedef alan PCR bazlı bir yöntemdir. RAPD metodu, iki yerine tek primer kullanımı ve bağlanma ısısının düşük olması açısından klasik PCRdan farklıdır. RAPD-PCR'ın klinik örnekler ve gıda örneklerinden izole edilen enterokokların tanımlanması ve ayrılmasında güvenilir bir teknik olduğu ileri sürülmüştür⁷⁰. Hastane kökenli VRE ların epidemiyolojik sürveyansında hızlı ve güvenilir bir teknik olduğu ancak yüksek düzeyde aminoglikozid direnci (HLAR) gösteren enterokokların tiplmesinde tekrarlanabilirliğinin düşük olduğu bildirilmiştir⁹³. Bazı çalışmalarda RAPD ve PFGE yöntemlerinin sonuçlarının oldukça uyumlu olduğu gösterilmiştir⁹⁴. Devriese ve ark. AP-PCR kullanarak *E.durans*, *E.hirae* ve *E.villorum*'un bütün suşlarını bant paternlerindeki farklılıklara göre gruplamıştır⁹⁵.

2.8.2.2.3- Spesifik ve Random Amplifikasyon-PCR: SARA-PCR

Tek bir reaksiyonda Enterokok türlerinin tanımlanması ve *vanA* geninin gösterilmesini sağlayan bir yöntemdir. Teknik *vanA* primer seti kullanımına dayalıdır. *vanA* geni bulunan suşlarda yaklaşık 700bp lik bant ile birlikte kompleks paternler oluşur⁷⁰.

2.8.2.2.4. Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Bu yöntem total genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile açık uçlu olarak kesilmesi sonrasında açığa çıkan DNA fragmentlerinin, ligaz enzimleri yardımı ile açık ucla uyumlu oligonükleotit adaptörleri ile ligasyonunu ve ligasyonla yerleştirilen oligoları hedef alan primerler kullanılarak amplifikasyonlarını hedef alan bir yöntemdir. Klasik PCR yöntemlerinde olduğu gibi amplikonların polimorfizmi, agaroz jelde veya kapiller elektroforezle tanımlanır. Roland Jureen ve arkadaşlarının(2003) çalışmasında enterokokları AFLP ve PFGE ile incelemiş ve bu iki tekniğin iyi bir uyum gösterdiğini bildirmişlerdir.⁹⁶. Ancak bazı çalışmalarda VRE ler için AFLP yöntemi PFGE ye kıyasla uyumsuz sonuçlar vermiştir⁹⁷.

2.8.2.2.5. Repetitive Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rep-PCR)

Repetitive-PCR metodu bakteriyel genomda dağılmış olarak bulunan tekrarlayan DNA dizilerinin kopyalarının PCR ile gösterimine dayalıdır. Bu tekrarlayan DNA elementleri cins ve türlere göre değişmek üzere genomda farklı uzaklıklar da yerleşmiştir. Bu tekrarlayan elementleri hedef alan primerlerin kullanıldığı amplifikasyon sonucunda değişik uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur. Bu fragmentlerin polimorfizmi spesifik DNA fingerprinting –parmak izi- olarak değerlendirilir. Yapılan kıyaslamalı çalışmalarda Rep-PCR ile oluşan polimorfik DNA kalıplarının yorumunun PFGE'i ile elde edilen kalıplara göre daha zor olduğu ve aralarında uyumsuzluk olduğu ileri sürülmüştür.^{70,98}.

2.8.2.2.6. İntergenik rRNA spacer bölgeleri-PCR (ITS-PCR)

Enterokok türleri için spesifik olan, 16S ve 23S rRNA arasında yer alan intergenik spacer bölgesini hedef alan primerlerin kullanıldığı bir amplifikasyon yöntemidir⁷⁰. Amplikonlar yüksek rezolüsyonlu %6 non-denatüre akrilamid-bisakrilamid jel elektroforezi ile incelenmiştir. Bu metotla incelenen *E.avium*, *E.raffinosus*, *E.malodoratus*, *E.pseudoavium*, *E.faecalis* ve *E. hirae* benzer profil göstermiştir. Daha ayırt edici sonuçlar elde edebilmek için ampikon Sau3A1 restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve ortaya çıkan fragment polimorfizmi ile *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. durans* ve *E. hirae* birbirinden ayırt edilebilirken *E. gallinarum* için spesifik polimorfizm tespit edilememiştir¹⁰⁰.

2.8.2.2.7. Diğer Amplifikasyon Bazlı yöntemler

Çeşitli klinik ve çevresel örneklerden izole edilen enterokokların cins, tür ve suş düzeyinde tanımlanması amacı ile bakteri genomundaki spesifik bölgeleri hedef alan çeşitli amplifikasyon bazlı modifikasyonlar kullanılmıştır. Bunlar arasında; 16S rDNA genini çevreleyen fragmanları hedef alan, “Amplified rDNA Restriction Analysis – ARDRA” yöntemi, PCR-Ribotipleme, SDS-PAGE ve 16S rDNA dizi analizinin kombinasyonu olan “PCR-amplified 16S rDNA- RFLP” yöntemi, groESL geninin spesifik primerlerle amplifikasyonu sonucu oluşan ampikonun HaeIII ve RsaI ile hazmı sonucu oluşan band polimorfizmini hedef alan “Broad range PCR-RFLP” yöntemi, özellikle klinik olarak önemli enterokok türlerinin tanımlanmasında yararlı olduğu ileri sürülen, DNA dizisinde tek nükleotit farklılığını Tm ısı farklılığı ile ortaya koyan “Temporal temperature gradient gel elektroforezi -TGGE” yöntemi, *E.casseliflavus*, *E.durans*, *E.faecalis* ve *E.faecium* suşlarının ayırımında başarı ile uygulanan “Denaturing Gradient jel elektroforezi –DGGE” yöntemi, insan ve hayvan orijinli enterokokal türlerin ayırımında denenmiş olan “tRNA-intergenik length polimorfizm analizi -tDNA-PCR” yöntemi, özellikle 16S rRNA ve 23S rRNA genleri olmak üzere ITS bölgeleri, Chaperonin 60 (Cpn60) geni, groES ve groEL genlerini, vanA, vanB, vanC ve vanD genini ve nihayet HLGR genlerini hedef alan problemlerin kullanıldığı “Nükleik asit Hibridizasyon” yöntemi, vanA ve vanB genlerini hedefleyen primerlerin

kullanıldığı, spesifik mRNA yı gösteren Reverse Transkriptaz- PCR (RT-PCR) yöntemi kullanım alanı bulan önemli yöntemlerdir⁷⁰.

2.8.2.3. Dizi Analizi Yöntemleri

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

2.8.2.3.1. Parsiyel Dizi Analizi

16S rDNA V4 ve V9 bölgelerine yönelik PCR analizini takiben yapılan parsiyel dizi analizi, enterokokların identifikasyonu ve sınıflamasında güvenilir bir tekniktir. VRE'lerin identifikasyonunda da multipleks PCR ile kombine olarak bu yöntem kullanılmıştır. Bu gen bölgesi dışında izolatların identifikasyonu için; ddl geni, cpn60 geni, groES geni, sodA genlerinin dizi analizi yapılması önerilmiş, Poyart ve arkadaşları (2000) tarafından özellikle *sodA* geninin dizi analizinin 16SrRNA geni dizi analizine göre daha diskriminatif olduğu ileri sürülmüştür¹⁰¹.

2.8.2.3.2. Multilokus Sequence Tipleme (MLST)

Pekçok bakteriyel türün virulans faktörlerinin ve moleküler epidemiyolojik özelliklerin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Housekeeping genlerin internal parçalarının DNA dizisindeki allelleri tanımlamaya dayalı bir yöntemdir. Enterokoklarda MLST nin, özellikle *E.faecium* suşlarının, uluslararası veri bankasını oluşturmada uygun bir teknik olduğu sonucuna varılmıştır¹⁰².

Sonuç olarak, enterokokları tanımlama, karakterize etmede ve tiplendirmede taksonomik ayırım yetenekleri değişen çok sayıda teknik kullanılmaktadır. Son 15 yılda metodolojik gelişmelerden dolayı bakteriyel taksonomi yeniden gözden geçirilmektedir. Özellikle enterokoklarda modern bakteriyel taksonomi çeşitli çalışmalarla elde edilen

geniş çaplı bilgilerle tamamlanmaktadır. Rutin incelemelerde klasik fenotipik yöntemlerin önemini hala koruyor olmasına rağmen, genotipik yöntemler mikroorganizmaların tam olarak karakterizasyonu ve klonal düzeyde ayırt edilmesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca bu teknikler yalnızca gıda mikrobiyolojisi alanında değil, bunun yanında epidemiyolojik araştırmalarda da güçlü bir araç olmaktadır. Polifazik bir yaklaşımla, feno ve genotipik modern yöntemlerin kombinasyonu güvenli identifikasyon için uygun bir çözümdür.

2.9. Enterokok Enfeksiyonlarının Tedavisi

Enterokok enfeksiyonlarının tedavisi, ilk seçenek antibiyotiklere karşı değişen düzeyde direnç göstermeleri sebebi ile oldukça zor ve karmaşıktır. Enterokokların neden olduğu üriner enfeksiyonlar, peritonit ve yara enfeksiyonlarının çoğu ampisilin, penisilin veya vankomisin gibi tek ilaçla tedavi edilebilirken; endokardit, bakteriyemi ve menenjit gibi ciddi enfeksiyonlar da hücre duvarına etkili bir ajanla bir aminoglikozitin birlikte uygulanması sinerjistik etki gösterir. Penisilin alerjisi olan hastalarda veya penisilin/ampisilin dirençli suşlarla olan enfeksiyonlarda vankomisin ve aminoglikozid kombinasyonu da sinejistik etkilidir. Ancak, yüksek düzeyde aminoglikozit ve ampisilin direncine ek olarak vankomisin direncinin de hızla yayılması, başta *E.faecium* enfeksiyonları olmak üzere VRE ile olan enfeksiyonların tedavisini, son derece problemli hale getirmiştir⁵.

E.faecalis izolatlarının hemen tamamı ampisiline orta düzeyde duyarlıdır. Bu yüzden bu izolatlarda vankomisin direnci olsa dahi, tedavileri nispeten kolaydır. Ancak penisilin ve ampisiline doğal olarak daha dirençli olan *E.faecium*'lar da vankomisin direnci görülmektedir^{5,53}.

Eğer VRE ampisiline yüksek düzeyde dirençli ise, tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, yüksek düzey aminoglikozit, rifampin, florokinolon, novobiosin ve üriner enfeksiyonlar için nitrofurantoin gibi antibiyotiklere duyarlılık araştırılmalıdır^{5,103}.

Farklı mekanizmalar ile direnç geliştiğinden, yüksek düzeyde gentamisin dirençli enterokoklarda streptomisin direnci araştırılmalıdır. Her iki aminoglikozide de direnç varsa, hiçbir tedavi rejiminin güvenilir bir bakterisidal etki oluşturması

beklenmemelidir. Çoklu ilaç direnci gösteren enterokoklarda tedavi seçenekleri oldukça kısıtlıdır ve optimal tedavi bilinmemektedir^{5,104}.

Kloramfenikol: çoklu ilaç direnci gösteren *E.faecium*'lara in vitro etkili olabilir ancak VRE enfeksiyonları tedavisinde sınırlı başarı gösterir, mortalitede azalmaya yol açmaz⁵

Seftriakson: glikopeptit direncini indüklediğinden normalde enterokoklara etkisizdir. Seftriakson, vankomisin ve gentamisin kombinasyonu, glikopeptit dirençli *E.faecium*'larda etkin olarak bildirilmiştir⁵.

Rifampin: Enterokokal enfeksiyon tedavisinde, zayıf bakterisidal etkisi ve direnç gelişiminden dolayı kullanımı kısıtlıdır¹⁰⁵.

Fosfomisin: Enterokoklara karşı etkinlik gösterir. Fakat tek başına kullanıldığında hızla direnç gelişir⁵.

Tetrasiklin: VRE'lerin bazılarına etkilidir. Doksisiklin ve minosiklin diğer ajanlar ile beraber kullanılabilir. Ancak tetrasiklin direnci oldukça yüksek oranda görülmektedir. Glisilsiklin olarak bilinen tetrasiklin deriveleri çoklu ilaç direnci gösteren enterokoklara mükemmel etkinlik göstermektedir. Bakteriyostatik etkilidir¹⁰⁶.

Siprofloksasin ve diğer kinolonlar: Enterokoklara orta derecede etkin ajanlardır ve kullanımları üriner enfeksiyonlar ile sınırlıdır. Gentamisin, ampisilin veya rifampin ile kombine kullanılırsa VR *E.faecium*'lara etkilidir. Yeni florokinolonlar ise Gram pozitiflere daha yüksek aktivite gösterirken enterokoklara karşı daha az etkindir. Klinafloksazin enterokoklara en etkin ajandır. Ampisilin ile kombine kullanılırsa bakterisidal etki gösterir^{5,107,108}.

Nitrofurantoin: Pek çok VRE ye karşı etkilidir ve üriner enfeksiyonlarda bir seçenek olabilir. Çoklu ilaç direnci gösteren enterokok tedavisinde etkin bir antimikrobiyal tedavi belirlenmemiştir⁵³.

Teikoplanin: VanB tipi enterokoklara etkin diğer bir glikopeptittir. Aminoglikozitlerle kombine edildiğinde endokarditlerde etkin olabilir. Ancak VanB tipi *E.faecium*'larda in vivo teikoplanin direnci geliştiği de bildirilmiştir. VRE enfeksiyonlarında yeni yaklaşımlar olarak beta laktam- beta laktam, beta laktam-glikopeptit, beta laktam- florokinolon kombinasyonları hayvanlarda incelenmiştir. Ampisilin ve vankomisine dirençli olmasına rağmen Beta laktam-glikopeptit

kombinasyonunun kullanımı ile *E.faecium* inhibe olabilir. Bazı suşlarda vankomisin varlığında ampisilin MİK değeri azalmaktadır¹⁰⁹.

Son yıllarda VRE/GRE enfeksiyonlarının tedavisinde yeni seçenek antibiyotikler denenmeye başlanmış olup bunlardan bir kısmı eski ürün olup yeni endikasyon alanı bulmuşken bazıları hala Faz III düzeyinde, bazıları da FazIV 'de klinik deneme aşamasındadır. Bunlardan en önemlileri ;

Dalfopristin-quinopristin: Streptogramin grubu antibiyotiktir ve VR *E.faecium* suşlarına karşı bakteriyostatik aktivite gösterir. Ancak *E.faecalis* suşlarına interensek direnç sebebi ile etkin değildir⁵³. Hayatı tehdit eden VR *E.faecium* bakteriyemilerinin tedavisinde onaylanmıştır. Protez kapak endokarditi, ventrikülit, katater ilişkili peritonitlerde etkin bulunmuştur⁵.

Daptomisin: Asidik bir lipopeptittir ve ümit verici klinik sonuçlar alınmaktadır. Enterokokların bütün türlerinde MİK değeri düşüktür, inokülüm etkisi zayıftır ve tek başına bakterisidal etkilidir. Glikopeptitler ile çapraz direnç görülmez¹¹⁰.

LY333328(oritavansin): Semisentetik bir glikopeptittir, VRE ye karşı en etkin ajanlardan birisidir ve bakterisidal etkinlik gösterir. Etki mekanizması tam bilinmemektedir. Ancak vankomisine benzer olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri ile ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır¹¹¹.

Oksazolidinonlar: Yeni sentetik antibiyotiklerdir. Protein sentezini inhibe ederler. Enterokoklara karşı etkinlikleri iyidir. Bu gruptan Linezolid FDA tarafından onaylanmıştır^{53,112}.

2.10. Enterokok Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol Önlemleri

Enterokok enfeksiyonlarının çoğu endojen kökenli olup, barsaklardan translokasyonla endojen kökenli sistemik enfeksiyona dönüşür. Ancak, hastanelerde yatan hastalarda, kolonize hasta ve kontamine çıkartıları ile direkt temasla, personelin kontamine elleriyle kontamine yüzeylerle temasla veya kontamine tıbbi aletler yoluyla indirekt olarak hastane enfeksiyonu şeklinde bulaşın da mümkün olduğu gösterilmiştir. Hastane enfeksiyonlarında enterokok enfeksiyonlarının, özellikle de tedaviye cevap vermeyen VRE/GRE gibi çoklu ilaç direnci gösteren suşlarla oluşan enfeksiyonların, 1980'li yıllardan sonra artış trendine girmesi ile Center for Disease Control and

Prevention (CDC) ye bağılı “Hospital Infection Control Practices Advisory Committee” (HICPAC) hastanelerde VRE yayılımını kontrol altına alabilmek amacı ile alınması gereken tedbirleri içeren bir rehber yayınlamıştır^{58,114}. Bu rehberde önerilen tedbirler;

1-Hastane personelinin eğitimi

Doktor, hemşire, hasta bakımından sorumlu personel, laboratuvar çalışanları, eczacılar ve öğrenciler gibi bütün hastane çalışanlarına VRE’nin önemi, epidemiyolojisi ve kontrolünün dair eğitim verilmelidir. VRE kontrol yöntemleri ve VRE yayılımını önleyici ilkeler konusunda düzenli olarak yılda en az bir kez eğitim yapılmalı ve VRE sıklığında artış olduğunda bilgi yenileme eğitimi şeklinde tekrarlanmalıdır^{58,113}.

2-Kısıtlı vankomisin kullanımı

Dirençli mikroorganizmaların kontrolünde antibiyotik kullanımının kısıtlanması son derece önemlidir. Hastanelerde uygun olmayan endikasyonlarda vankomisin kullanımı VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu için önemli bir risk faktörüdür. Ayrıca üçüncü kuşak sefalosporinler ve anti-anaerobik etkinliği olan antibiyotiklerin kullanımı da riski artırmaktadır. Bu sebeple özellikle VRE kontrolünde antibiyotik kullanımı konusunda eğitim çalışmalarına önem verilmeli, HICPAC önerileri dikkate alınmalıdır^{58,113,114}.

3-Mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı

Mikrobiyoloji laboratuvarı tüm hastane enfeksiyonlarında olduğu gibi VRE sürveyansında ve yayılımının önlenmesinde oldukça önemli bir basamaktır. VRE ile kolonize veya infekte hastaların en kısa sürede ve doğru olarak tespit edilmesi, duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi, kontrol önlemlerinin erken dönemde uygulanabilmesini ve yayılımın sınırlandırılmasını sağlar. Bir hastanede VRE bir kez izole edildiğinde mutlaka vankomisin duyarlılığı yönünden tekrar test edilmesi ve enfeksiyon kontrol komitesine ve hastanın izlendiği servise bildirilmesi gerekir. Böylece sonuç belli olana kadar hastanın izole edilmesi sağlanmalıdır. Rutin tarama kültürleri ile kolonizasyonun tespiti ve izole edilen VRE suşları arasındaki klonal ilişkinin moleküler tipleme yöntemleri ile ortaya konulması da enfeksiyon kontrol önlemleri açısından önem taşımaktadır^{58,113,114}.

4-Sürveyans kültürleri

İntestinal kolonizasyonunun belirlenmesi amacıyla sürveyans kültürlerinin alınması VRE kontrol programının en önemli basamaklarından birisidir. Prevalans

taramaları yeni bir VRE pozitif hasta tespit edildiğinde sadece aynı odada izlenmekte olan hastaların taraması ile sınırlı olabileceği gibi, aynı servisteki bütün hastaların veya yoğun bakım, transplantasyon, hematoloji onkoloji ünitesi gibi birimlerde izlenen yüksek risk grubundaki hastaların taranması şeklinde daha geniş kapsamlı olabilir. Kolonizasyon tespitinde diğer bir yaklaşım ise *C. difficile* toksini araştırılmak üzere gönderilen gaitaların VRE yönünden taranmasıdır. Ayrıca VRE'nin yaygın olduğu hastanelerden veya bakımevlerinden transfer edilen hastalardan perirektal kültür alınması da diğer bir uygulamadır^{58,114,116}.

5- Gastrointestinal kolonizasyonun eradikasyonu

Vankomisin dirençli enterokok eradikasyonunda amaç, kolonizasyonu olanlarda enfeksiyon gelişme riskini azaltmak, hastanedeki VRE rezervuarını sınırlamak ve enfeksiyon kontrolüne yönelik harcamaları azaltmaktır. Ancak kalıcı eradikasyon sağlayacak antimikrobiyal tedavi henüz bilinmemektedir⁵⁸. VRE kolonizasyonunun eradikasyonunda, *Lactobacillus rhamnosus* içeren yoğurt kullanılmış ve başarılı bulunmuştur⁶⁵.

Vankomisin dirençli enterokoklar ile kolonize hastalarda spontan dekolonizasyon nadir olarak oluşmaktadır. Mayo Klinikte yapılan bir çalışmada; karaciğer ve böbrek transplantasyonu yapılmış hastalarda spontan dekolonizasyon oranı %34 bulunmuştur. Oral basitrasin, ramoplanin ve novobiyosin gibi antimikrobiyallerin kullanımı VRE eradikasyonunda kısıtlı başarı göstermiştir.^{5,53}.

6-Korunma ve Kontrol

Hastane içerisinde hastalar arasında enterokok yayılımında, temasın engellenmesi yani izolasyon en önemli korunma yöntemidir. Teması ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için; sağlık personeli arasında el antisepsisi, eldiven ve koruyucu önlük kullanımı gibi uygulamalar yaygınlaştırılmalı ve özendirici tedbirler alınmalıdır. Yapılan çalışmalarda hastane personelinin ellerinin hastalar arası bulaşta önemli bir vektör olduğu gösterilmiştir. Maryland Üniversitesi'nde yoğun bakım ünitelerinde aktif sürveyans uygulanmasının VRE geçişini %39 oranında azalttığı gösterilmiştir. Bir başka çalışmada önlük kullanımının 400.000 dolardan fazla yıllık tasarruf sağladığı bildirilmiştir⁵³.

Bir VRE salgınında salgının önlenmesi amacı ile;

- a- VRE ile infekte veya kolonize hastalar tek kişilik odalara veya VRE pozitif diğer hastalarla aynı odaya yerleştirilmeli,
- b- VRE pozitif hasta odasına girerken eldiven ve önlük giyilmeli; hasta odasından ayrılmadan önce eldiven ve önlük çıkarılıp eller antiseptik ajanlarla yıkanmalı ve eller yıkandıktan sonra hasta odasındaki yüzeylerle temas edilmemeli,
- c- VRE pozitif hastalarda kullanılan tıbbi aletler diğer hastalar için kullanılmamalı, ortak kullanılacaksa dezenfekte edilmeli ve odalar arası eşya transferinden kaçınılmalı,
- d- VRE pozitif hasta ile aynı odada izlenen hastalardan gaita veya rektal sürüntü kültürleri alınarak kolonizasyon yönünden araştırılmalı ve VRE kolonizasyonu uzun süre devam edebildiği için, en az bir hafta arayla alınmış üç veya daha fazla negatif kültür sonucu elde edilene kadar araştırmaya devam edilmelidir.
- e- VRE yayılım şekillerini ve rezervuarı belirlemek amacıyla uygun moleküler yöntemler kullanılarak klonal ilişki yönünden değerlendirilmelidir.
- f- Sağlık personelinde VRE taşıyıcılığı ve buna bağlı VRE yayılımı bildirilmiş olmakla beraber sağlık personelindeki taşıyıcılık VRE için tanımlanmış önemli bulaş yollarından biri değildir. Ancak VRE yayılımı kontrol altına alınamıyorsa, sağlık personeli kronik cilt ve tırnak problemleri yönünden incelenmeli, epidemiyolojik olarak VRE yayılımı ile ilişkili olduğu belirlenen VRE taşıyıcısı personelin VRE negatif hastalara bakım hizmeti vermesinden kaçınılmalıdır^{58, 113, 114, 115, 116}.

3-GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez laboratuvarına 10.09.2009 ile 30.04.2010 tarihleri arasında farklı kliniklerden gönderilen klinik materyallerden izole edilen 79 enterokok izolatu, muhtemel bir hastane enfeksiyonu salgınına delil teşkil etmek üzere klonal ilişkilerinin tespiti amacı ile değerlendirilmiştir. Enterokokların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının tespitinde Vitek-2 otomatize sistemi (BioMerieux, Durham, NorthCarolina, USA) kullanılmış, klonal ilişkinin tespitinde ise RAPD ve PFGE yöntemleri kullanılmıştır.

3.1. Tür tayini ve Vankomisin duyarlılıklarının tespiti

Hasta örneklerinden kanlı besiyerine yapılan ekimler 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış, süre sonunda besiyerinde üreyen, küçük non hemolitik veya alfa hemolizli, katalaz negatif bakteri kolonilerinden, yayma preparatlar hazırlanmıştır. Bu yaymalarda Gram pozitif koklar şeklinde görünen bakteri kolonileri enterokok şüpheli olarak kabul edilmiş ve pasajlar yapılarak saf kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen saf kültürler, Vitek-2 otomatize sistemi (BioMerieux, Durham, NorthCarolina, USA) yardımı ile cins ve tür düzeyinde tanımlanarak antibiyotik duyarlılıkları tespit edilmiştir. Sistem için özel kullanılan şeffaf plastik deney tüpüne (12x75 mm) 3 ml steril tamponlanmış tuzlu su (%0,45-0,50 NaCl, pH 4.5-7.0) konulmuş, saf koloniler öze ile tüpe aktarılmış ve McFarland 0.5 bulanıklığına eşdeğer homojen bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. İncelenen her suş için iki tüp kullanılmıştır. Birinci tüpe kolonilerden hazırlanan bakteri süspansiyonu konulmuş ve ikinci tüp ise boş olarak kasete yerleştirilmiştir. Kasetin içerisinde bulunan, tüplerin arka kısmındaki bölüme, birinci tüpün arkasına Gram pozitif identifikasyon kartı (Vitek-2 GP, BioMerieux-SA-France) ve boş tüpün arkasına ise Gram pozitif antibiyotik duyarlılık kartı(Vitek-2-AST-P534 BioMerieux-SA-France) takılmış ve kullanım talimatına uygun olarak kaset

Vitek-2 sisteminin içine yerleştirilmiş ve veri girişi yapılmıştır. 18-24 saat, 37°C'de inkübasyon sonrası, hem cins düzeyinde, hem tür düzeyinde tanımlanmaları gerçekleştirilmiş, hem de enterokok olarak tanımlanan izolatlar antibiyotik duyarlılıkları yönünden sistemde değerlendirilmiştir.

Saf kültür halinde izole edilen enterokoklar, suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılan genotipleme çalışmalarında daha sonra kullanılmak üzere, %10 gliserol ve %10 kan içeren Beyin-kalp infüzyon sıvı (BHIB) besiyerinde (BBL, Brain-Heart infusion broth), -20°C'de, saklanmıştır.

Suşların 49'u (%62,02) hastalara ait klinik materyalden ve 30'u (%37,98) yatan hastalara ait gaita veya rektal sürüntü örneklerinden elde edildi. Klinik materyalden izole edilen suşların 33'ünün (%67,34) hastane enfeksiyonu kriterlerine uyan hastalara, 16 (%32,66)'sının da hastane enfeksiyonu ile uyumlu olmayan, yeni yatış alan hastalara ait olduğu tespit edildi.

Çalışmada test edilen enterokoklar üç grup altında değerlendirildi:

I.Grup: Hastane enfeksiyonu ile ilişkili 10.09.2009 ile 30.04.2010 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 33 VRE izolatından oluşmuştur. Bu izolatlar hastanede yatan hastalarda, yatışı izleyen üçüncü günden sonra ortaya çıkan enfeksiyonlardan izole edilmiştir.

Bu grupta değerlendirilen izolatların elde edildiği hastaların, 15'inin (%45,45) kadın ve 18'inin (%54,54) erkek olduğu tespit edilmiştir. İzolatların farklı kliniklerde takip edilen hastalara ait oldukları görülmüştür (Tablo 5).

Tablo 5. Grup I’de değ rlendirilen VRE lerin kliniklere g re dağılımı

<i>Klinik</i>	<i>Suş sayısı</i>
Dahiliye Yoğun Bakım	8
Çocuk Yoğun Bakım	5
Beyin Cerrahi Yoğun Bakım	1
Çocuk Hematoloji	2
Hematoloji	2
Diğer Klinikler	15
Toplam	33

Bu grup da değ rlendirilen VRE’lerin  oėu idrar  rneklerinden izole edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Grup I’de değ rlendirilen VRE lerin izole edildikleri klinik materyale dağılımları

<i>İzole edilen klinik materyal</i>	<i>VRE suş Sayısı</i>	<i>VRE suş %</i>
İdrar	13	39,39
Kan	7	21,21
Karın içi aspirasyon mayii	3	9,09
Apse	2	6,06
BOS	2	6,06
Trakeal aspirat	1	3,03
Balgam	1	3,03
Kateter ucu	1	3,03
Peritoneal mayii	1	3,03
Yara	1	3,03
Konjonktival sürüntü	1	3,03
Toplam	33	100

2. Grup: Bu grupta 15.09.2009 ile 04.01.2010 tarihleri arasında, hastanede yatarak tedavi edilen hastaların, gaita ve perirektal sürüntü örneklerinden izole edilen ve intestinal kolonizasyon olarak değerlendirilen 30 VRE izolatı yer almıştır. Suşların büyük bir kısmının çocuk hematoloji servisinde takip edilen hastalara ait örneklerden izole edildiği görülmüştür (Tablo 7).

Tablo 7. Grup II de değerlendirilen VRE izolatlarının kliniklere göre dağılımı

<i>İzole edilen klinik materyal</i>	<i>VRE suş sayısı</i>	<i>VRE suş %</i>
Çocuk hematoloji	13	43,33
Çocuk yoğun bakım	7	23,33
Çocuk onkoloji	4	13,33
Yanık	2	6,66
Dahiliye yoğun bakım	1	3,33
Beyin cerrahi yoğun bakım	1	3,33
Genel çocuk kliniği	1	3,33
Hematoloji	1	3,33
Toplam	30	100

3.Grup: Bu grupta 02.03.2010 ile 30.03.2010 tarihleri arasında polikliniklerden takip edilen veya hastanede yatan ancak hastane enfeksiyonu tanımına uymayan enfeksiyonu olan hastalardan alınan klinik materyalden izole edilen 16 Vankomisin duyarlı enterokok (VSE) izolatı yer almıştır. Kontrol olarak değerlendirilen bu izolatların 9 (%56,25)'u kadın, 7 (%43,75)'si erkek hastalardan izole edilmiştir. Suşların izole edildiği kliniklere göre dağılımlarında bir özellik tespit edilememiş (Tablo 8), ancak en fazla izolatın idrar örneklerinden izole edildiği görülmüştür (Tablo 9).

Tablo 8. Grup III de değerdendirilen VSE'ların izole edildikleri kliniklere göre dağılımı

<i>Klinik</i>	<i>Suş sayısı</i>	<i>Suş %</i>
Yanık	2	12,5
Çocuk kliniği	2	12,5
Üroloji	2	12,5
Hematoloji	1	6,25
Nefroloji	1	6,25
Dahiliye yoğun bakım	1	6,25
Cerrahi yoğun bakım	1	6,25
Beyin cerrahi yoğun bakım	1	6,25
Onkoloji	1	6,25
Cerrahi transplantasyon	1	6,25
İnfeksiyon hastalıkları	1	6,25
Fizik tedavi rehabilitasyon	1	6,25
Kadın hastalıkları-Doğum	1	6,25
Toplam	16	100

Tablo 9. Grup III de değerdendirilen VSE'ların izole edildikleri klinik materyale göre dağılımı

<i>Klinik materyal</i>	<i>Suş sayısı</i>	<i>Suş %</i>
İdrar	7	43,75
Yara	5	31,25
Kateter kanı	1	6,25
Balgam	1	6,25
Sonda ucu	1	6,25
Vajinal sürüntü	1	6,25
Toplam	16	100

3.2 Klonal ilişkinin tespiti

Klinik materyalden izole edilen VRE ve VSE suşlarının hastane kökenli salgın suşları mı yoksa salgın dışı endojen kaynaklı münferit suşlar mı oldukları anlamak için yüksek ayırım gücüne sahip genotipik yöntemlerle tiplendirilmelidir. Bu çalışmada klonal ilişkinin tespitinde altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemi ile PFGE yönteminin uygulanamadığı laboratuvarlar için iyi bir alternatif olarak önerilen RAPD yöntemleri kullanılmış ve ayırım güçleri irdelenmiştir. Yöntemlerin tekrarlanabilirliği ve stabilitesini tespit etmek amacıyla PFGE ve RAPD yöntemi ile yapılan inceleme iki kez tekrarlanmıştır.

3.2.1-PFGE

PFGE ile yapılan incelemede, L.Garcia-Migura ve arkadaşlarının (2005) yöntemine uygun olarak hazırlanan kalıplar, Turabelidze ve arkadaşlarının(2000) önerdiği elektroforez şartlarında, CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium)cihazında yapıldı^{17,118}. Çalışma 8 adımda tamamlandı.

3.2.1.1-İzolatların hazırlanması

Örnekler 7 basamaklı işlem ile PFGE için hazır hale getirilmiştir. Bunlar;

1. Tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı.
2. Bir gecelik 37°C de inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edildi.
3. Buradaki tek koloniden tekrar kanlı agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde, pasaj yapılarak 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.
4. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içinde süspanse edildi.
5. Bakteri yoğunluğu, yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı olacak şekilde ayarlandı.

6. Bu süspansiyondan 240 µl 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 10mg/ml lizozom içeren stok solüsyondan 60 µl eklendi.

7. Bu tüpler 37°C de benmaride (Mettler Wne-14 Waterbath) 10 dakika inkübe edildi.

3.2.1.2 -İzolatların agaroz gömülmesi

1. HST içerisinde %2'lik düşük erime ısılı agaroz (BIO-RAD Low melting Agar 161-3113EDU) hazırlandı. Düşük erime ısılı agarozdan 25 ml lik balonun içerisine 0,2 g konuldu ve üzerine 9 ml HST eklendi. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutuldu, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konuldu. Daha sonra içerisine %1 sodyum dodesil sülfat ve 0,2 mg/ml proteinaz K olacak şekilde stok solüsyonlardan eklendi. 1.5 ml'lik ependorf tüplere 200 µl dağıtıldı ve 45–50°C'deki kuru ısı bloğunda kullanılabilecek kadar bekletildi.

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

3. İnkübasyondan sonra hemen bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisine 200 µl düşük erime ısılı agaroz bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı.

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

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

3.2.1.3 - Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1- 5 ml'lik steril kapaklı tüplere, 1 ml hücre lizis solusyonu konuldu ve 150 µg /ml proteinaz K eklendi.

2- İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirildi.

3- Kalıplar 54°C’de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

3.2.1.4 -Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

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

3- Daha sonra agaroz kalıpları önce 15 ml ultrapür saf su ile iki defa ve 15 ml TE tamponuyla dört defa olmak üzere 50°C’de 15 dakika süre ile yıkandı. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

3.2.1.5. Agaroz kalıpları içindeki DNA’nın RE ile kesilmesi

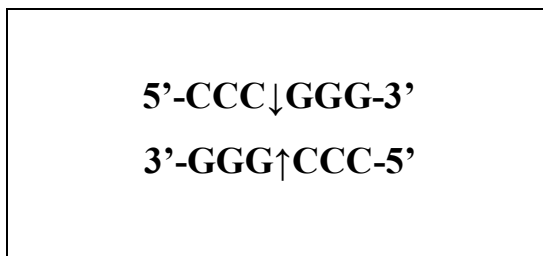
1- DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Restriksiyon enzimi olarak SmaI (Şekil8) kullanıldı. Parçalardan biri, 100 µl 1x SmaI tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 30°C’de 10-15 dakika bekletildi. (Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde +4°C’de saklandı).

2- Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde kalıp başına 25 ünite SmaI enzimi (Fermentas, Lot: 00015137) konuldu.

10 µl 10x SmaI tamponu,

2.5 µl SmaI enzimi (10 U / µl) (Fermentase)

87.5 µl steril distile su (Reagent Grade Type 1)



Şekil 8. *SmaI* restriksiyon enziminin hedef aldığı baz dizisi ve kesim bölgesi.

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

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

3.2.1.6 - Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi

1- 100 ml 0.5x TBE içinde %1.2’lik agaroz (Pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı.

a- 1g “pulsed-field certified agarose” balona konuldu.

b- Üzerine 100 ml 0.5x TBE tamponu eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.

c- Balonun ağzı aliminyum folyo ile kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutuldu, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı ve tekrar 15 saniye mikrodalga fırında tutuldu.

d- Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C’lik su banyosuna konuldu.

2- Agaroz dökülecek kaset hazırlandı. Su terazisi ile düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konuldu.

3- RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar veya moleküler standart marker yüklendi.

4- Kurutma kâğıdı veya kağıt havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA’nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.

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

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

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

3.2.1.7-Elektroforez

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

	BLOK-1	BLOK-2
Başlangıç vuruş süresi	3,5 sn	1 sn
Bitiş vuruş süresi	20 sn	5 sn
Akım	6 V/cm ²	6 V/cm ²
Sıcaklık	12°C	12°C
Süre	12 saat	8 saat

3.2.1.8 - Sonucun gözlenmesi ve analizi

1- Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınıp 20 dakika boyandı.

2- Sonra UV ışığı altında görüntülendi.

3- Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.

4- GelCompar II yazılım sistemi (version 5.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan üç adet standart (1, 7, 15. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. “Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)” kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1,5 olarak alındı. Bant profilleri %80 benzerlik gösteren izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi

ve büyük harfle isimlendirildi. Aynı küme içerisindeki subtipler ise rakamlar ile gösterildi.

3.2.1.9. PFGE Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

Pulsed field jel elektroforez yönteminde kullanılan solüsyonlar laboratuvarımızda aşağıda tarif edildiği gibi hazırlandı.

3.2.1.9.1- Hücre süspansiyon tamponu (TE buffer)

Tris HCl(SIGMA T-3253)..... 1.576 gr
EDTA(AMRESCO 0105-500)..... 0.3722 gr
Ultrapure su.....1 lt ye tamamlandı.
Tris ve EDTA eritilip, NaOH ile pH'sı 8.0'a ayarlandı.

3.2.1.9.2- Lizis Solüsyonu

Tris-HCl (SIGMA T-3253)..... 7:88gr
EDTA(AMRESCO 0105-500).....18.61 gr
N-lauryl Sarcosine(AMRESCO 0719-500).....10gr
Ultrapure saf su.....1 litreye tamamlandı.
Tris ve EDTA eritilip, pH 8.0'a ayarlandıktan sonra N-lauryl Sarcosine eklendi.

3.2.1.9.3- TBE 0.5x

Tris base (SIGMA T-1503).....5.3845 gr
Borik asit (MERCK 1.00165.0500)..... 2.75 gr
EDTA (AMRESCO 0105-500)..... 0.3722 gr
Ultrapure saf su.....1 litreye tamamlandı.
Maddeler eritildikten sonra pH 8.0'a ayarlandı.

3.2.1.9.4- Lizozim solüsyonu

Lizozim (Amresco, Ohio, Lot 2266B016) 0.1gr
Distile su 10 ml

3.2.1.9.5- %10 sodium dodecyl sulfate solüsyonu

Sodium dodecyl sulfate (SIGMA L-5750)..... 10gr
Ultra pure saf su 100ml

3.2.1.9.6- 20mg/ml proteinase K solüsyonu

Proteinaz K (Roche, Lot 11207200) 100 mg
Distile su5 ml

3.2.2- Randomly Amplified Polimorfik DNA

Yanmen Wang ve arkadaşlarının metoduna uygun olarak yapılan RAPD yöntemi ile bakteri DNA'sı random seçilmiş kısa primer (S13-5'-TTCCCCCGCT-3') ile düşük annealing ısısında amplifikasyona tabii tutulmuştur. Non-spesifik olarak DNA üzerinde random bağlanan oligolarla elde edilen amplikonlar agaroz jelde elektroforeze tabii tutularak elde edilen amplikonların polimorfizmine göre klonalite tayini yapılmıştır¹¹⁹.

3.2.2.1- Kültür plaklarından DNA ekstraksiyonu

1. Saf olarak elde edilen enterokok kolonileri distile su ile Mc Farland 5 bulanıklığında süspanse edildi.
2. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 500µl ependorf tüpe alınarak, 8000 xg de 3 dakika oda ısısında santrifüj (HERAEUS Biofuge Primo R) edildi.
3. Üst sıvı atılıp ve pelletin üzerine 500 µl TE buffer (10mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA, pH7.5) eklendi.

4. Daha sonra 100°C’de, 10 dakika kuru ısı bloğunda (BİOSAN Termoblock TDB-120) tutuldu.
5. 500 µl bakteri süspansiyonuna 150 µl boncuk(SIGMA) konuldu ve Mickle cihazında (Mickle Tissue Disintegrator, Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.) maksimum hızda (10), 7 dakika mekanik lizise uğratıldı.
6. 12.000 xg de 10 dakika santrifüj edildi.
7. 200 µl süpernatant alınıp ve yeni bir ependorfa aktarıldı. Spektrofotometrede (CHEBIOS s.r.l. Optimum-One UV-VIS Spectrophotometer) DNA kantitasyonu yapılan örnekler PCR ile amplifikasyon işleminde kalıp olarak kullanılmaya kadar – 20°C de saklandı.

3.2.2.2- S13 primeri ile amplifikasyon

Enterokok izolatlarından elde edilen DNA ekstraktları, random amplifikasyon için kısa oligolardan hazırlanan S13 (5’-TTC CCC CGCT-3’) primeri kullanıldı. Amplifikasyon; 2.5 µl 10x PCR buffer, 3.5 mM MgCl₂, herbir dNTP’den 200 µM, 0.8 µl primer (100pmol/ µl stok solüsyondan), 3 U Taq polymerase ve 3 µl kalıp DNA (100ng/µl) ve steril distile su ile toplam 25 µl’ye tamamlanan PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cycler) aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı:

94°C’de 5 dak. ilk denaturasyon	} 45 siklus
94°C’de 50 sn. denaturasyon	
37°C’de 1 dak. bağlanma (annealing)	
72 °C’de 75sn uzama (extension)	
72°C’de 10 dak. son uzama	

3.2.2.3- Fragmentlerin agaroz gel elektroforezi ile tespiti

Amplifikasyon işlemi sonrasında oluşan farklı büyüklükteki fragmentlerin varlığını gösterebilmek amacı ile ampikonlar elektrikli ortamda agaroz jel içerisinde migrasyonel seperasyona tabii tutuldu. Bu işlem aşağıdaki şekilde yapıldı;

1. Elektroforez matriksi olarak kullanılmak üzere % 2’lik agaroz jel 1xTBE solüsyonu ile hazırlandı.

- a. Bir balon içerisine tartılarak konulan 2 gr agaroz (Sigma Agarose A5093-500G) üzerine 100 ml 1xTBE ilave edildi.
 - b. Karışım homojenizasyon sağlanana kadar mikrodalga fırında eritildi.
 - c. Oda ısısında 60 °C'nin altına düşmeyecek şekilde bekletilerek soğutuldu.
 - d. Eriyik haldeki agaroz içerisine 10 mg/ml'lik etidyum bromid stok solüsyonundan 5 µl eklenerek, % 0,5 mg/ml son konsantrasyon elde edildi.
 - e. Hazırlanan % 0,5 ethidium bromid içeren % 2'lik agaroz jel, önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.
 - f. Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilerek jel kalıbının katılaşması sağlandı.
 - g. Jel kalıbı elektroforez tankına (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) yerleştirilerek taraklar yavaşça çıkarıldı.
2. Örneklerden 15'er µl alınarak parafilm üzerinde % 20 sükröz, % 0,25 brom fenol mavisi ile hazırlanmış 6x konsantrasyondaki 3 µl yükleme tamponuna karıştırıldı. İlk ve 7. kuyuya DNA markeri (Fermentas O'Range Ruler, 100bp Ladder, Lot: 0302) ve diğer kuyulara her birine bir örnek olacak şekilde bu karışımdan 18 µl yüklendi.
3. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) çalıştırılarak 120 V akım verildi. Brom fenol mavisinin jeldeki migrasyonu takip edilerek, boya jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.

3.2.2.4- Görüntüleme ve Bant Profillerinin Analizi

- 1- Elektroforezden sonra jel UV ışığa altında görüntülendi. Gel logic 1500 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kayıt edildi.
- 2- GelCompar II yazılım sistemi (version 5.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde bulunan 2 adet standart (1.ve 7. kuyucuklarda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" kullanılarak bant profillerinin, dendrogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, %1.5 olarak alındı.

4.BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarlarında çeşitli klinik materyallerden izole edilen 79 enterokok izolatının enterokok kökenli hastane enfeksiyonlarında; tür dağılımı ve epidemiyolojik özellikleri belirlemek amacı ile; glikopeptit türü antibiyotiklere karşı direnç düzeyleri ile PFGE ve RAPD yöntemleri kullanılarak klonal ilişkilerinin değerlendirildiği bu çalışmada;

a-Fenotipik kriterlere göre yapılan tür tanımlamasında izolatlardan 69 (%87,34)'unun *E.faecium*, 7(%8,9)'sinin de *E.feacalis* olduğu görülmüştür (Tablo10).

Tablo 10. Çalışmaya dahil edilen enterokok izolatlarının türlere dağılımı

<i>Tür</i>	<i>Sayı</i>	<i>%</i>
<i>E faecium</i>	69	87,34
<i>E feacalis</i>	7	8,86
<i>E gallinorum</i>	1	1,26
<i>E.avium</i>	1	1,26
<i>E.hirae</i>	1	1,26
Toplam	79	100

b-Örnek protokol numaraları sorgulandığında, *E faecium* olarak tanımlanan 69 izolatın 31 (%44,92)'inin hastane enfeksiyonu tanısı alan hastalara ait örneklerden, 8(%11,59)'inin hastane enfeksiyonu olmayan ancak klinik yakınmaları olup klinik ve polikliniklerde takip edilen hastalara ait örneklerden ve 30 (% 43,47)'unda yatan

hastaların perirektal bölgelerinden alınan sürüntü örneklerinden izole edilen ve endojen kolonizasyonla ilişkili izolatlar oldukları tespit edilmiştir. *E. faecalis* olarak tanımlanan izolatların tamamının ise hastane enfeksiyonu olmayan klinik ve polikliniklerde takip edilen hastalara ait örneklerden izole edildiği görülmüştür (Tablo 11).

Tablo 11. Enterokok izolatlarının izole edildiği örnek gruplarına dağılımı.

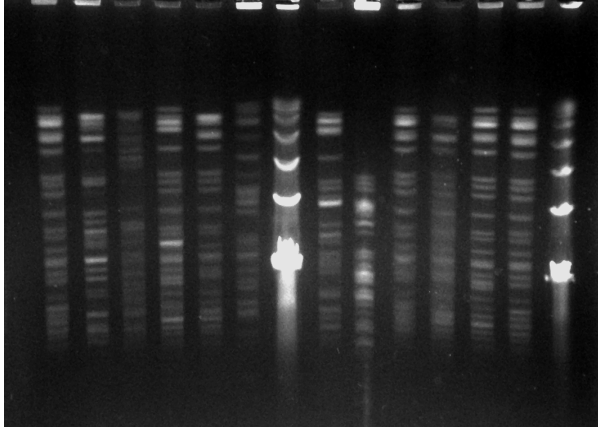
İzolat	Sayı	Hastane enfeksiyonu		Diğer		Kolonizasyon	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<i>E. faecalis</i>	7	-	-	7	100	-	-
<i>E. faecium</i>	69	31	44,92	8	11,59	30	43,47
<i>E. gallinorum</i>	1	1	100	-	-	-	-
<i>E. avium</i>	1	1	100	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	1	-	-	1	100	-	-
Toplam	79	33	41,72	16	20,25	30	37,97

c- Hastane enfeksiyonu tanısı alan hastalara ait örneklerden izole edilen ve *E. faecium* olarak tanımlanan 31 izolatın tamamının Vankomisine dirençli (>128 µg/ml) olduğu, bu suşlar arasında Teikoplanin direncinin ise %93,5 (29/31) olduğu tespit edilmiştir. Kolonizasyonla ilişkili olan *E. faecium* suşlarının tamamının vankomisine dirençli olduğu, hastane enfeksiyonu olmayan ancak klinik yakınmaları olup klinik ve polikliniklerde takip edilen hastalara ait örneklerden izole edilen *E. faecium* izolatlarının ise tamamının vankomisin ve teikoplanine duyarlı oldukları tespit edilmiştir (Tablo12).

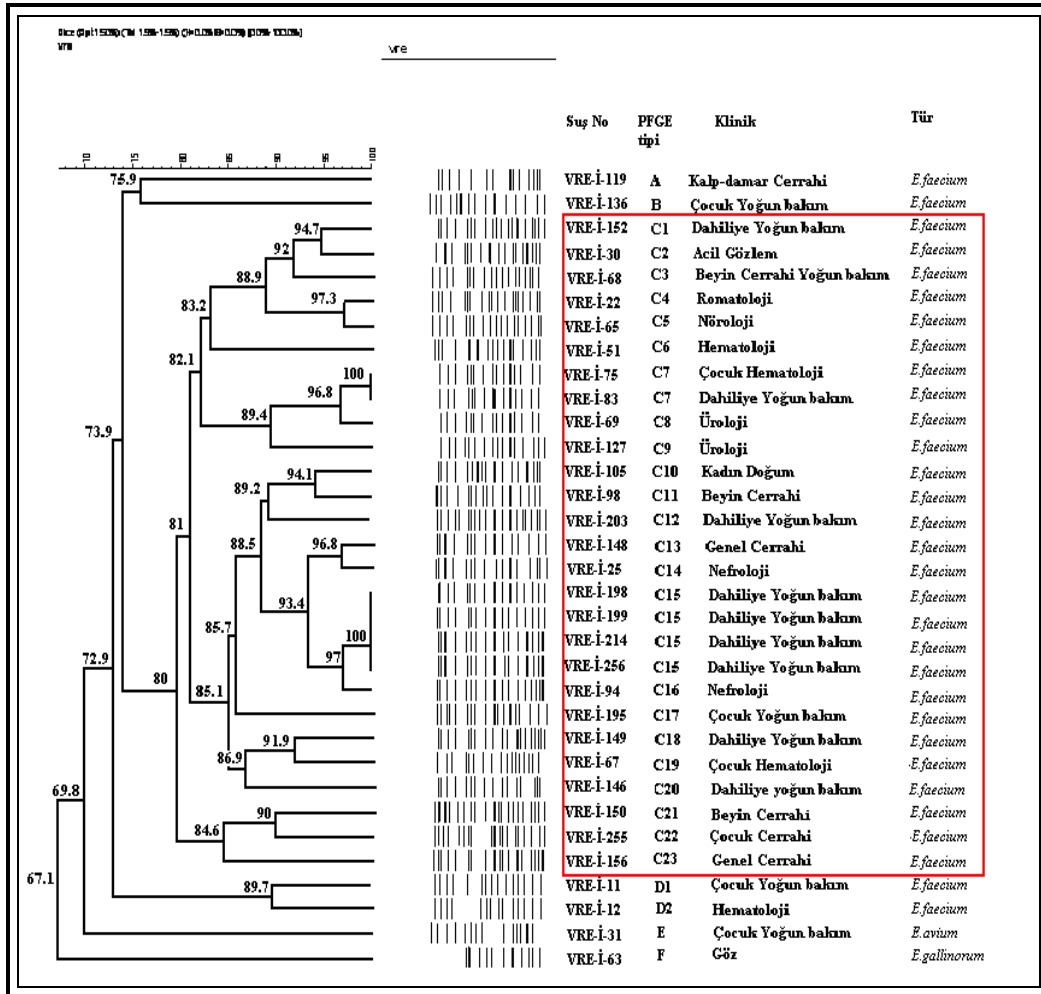
Tablo 12. Enterokok izolatlarının glikopeptit türü antibiyotiklere duyarlılıkları.

İzolat	Tür	Sayı	Vankomisin MİK µg/ml			Teikoplanin MİK µg/ml	
			>128	64-16	< 16	>16	<16
			S (%)	S (%)	S (%)	S (%)	S (%)
Klinik materyal	<i>E.faecium</i>	31	31(100)	- -	- -	29(93,5)	2 (6,5)
	<i>E.gallinorum</i>	1	- -	1 (100)	- -	- -	1 (100)
	<i>E.avium</i>	1	1 (100)	- -	- -	1 (100)	- -
Diğer	<i>E.faecium</i>	8	- -	- -	8 (100)	- -	8 (100)
	<i>E.faecalis</i>	7	- -	- -	7 (100)	- -	7 (100)
	<i>E.hirae</i>	1	- -	- -	1 (100)	- -	1 (100)
Kolonizasyon	<i>E.faecium</i>	30	30 (100)	- -	- -	24 (80)	6 (20)
	Toplam	79	62(78,4)	1(1,2)	16(20,2)	54(68,3)	25(31,6)

d- Hastane enfeksiyonu tanılı hastalara ait klinik materyallerden izole edilen 31 *E.faecium* ile *E.gallinorum* ve *E.avium* izolatlarının muhtemel klonal ilişkiyi belirlemek amacı ile genomik özelliklerinin PFGE yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu; büyüklükleri 10 kb ile 300 kb arasında değişen 10-20 banttıan oluşan bir profil oluşturdıkları (Şekil 9) ve GelComparII programı ile değerlendirilen bant profillerine göre izolatların 6 farklı gen klonuna dağıldıkları görüldü. *E.faecium* olarak tanımlanan izolatların, en büyüğü en az % 80 benzerlik gösteren 27 üyeli ve 23 subtip içeren “C” kümesi olmak üzere, “A-D” olarak tanımlanan 4 küme içerisinde yer aldıkları, farklı türler olarak tanımlanan *E.avium* ve *E.gallinorum* izolatlarının da beklendiği gibi birbirleri ve *E.faecium* izolatları ile klonal olarak ilişkisiz olan ve “E- F” olarak tanımlanan iki farklı özel kümeyi oluşturdıkları görüldü (Şekil 10). “C” kümesi içerisinde %100 uyumlu 4 izolatın yer aldığı C15 alt kümesinin tamamının 3 aylık periyotta dahiliye yoğun bakım ünitesinde takip edilen hastalardan izole edilmiş olması, bu suşun salgın suşu olduğunu düşündürdü. Nitekim Dahiliye Yoğun bakım servisinden gönderilen örneklerden üretilen 9 enterokok izolatının tamamının da C kümesi içerisinde yer aldığı görüldü.

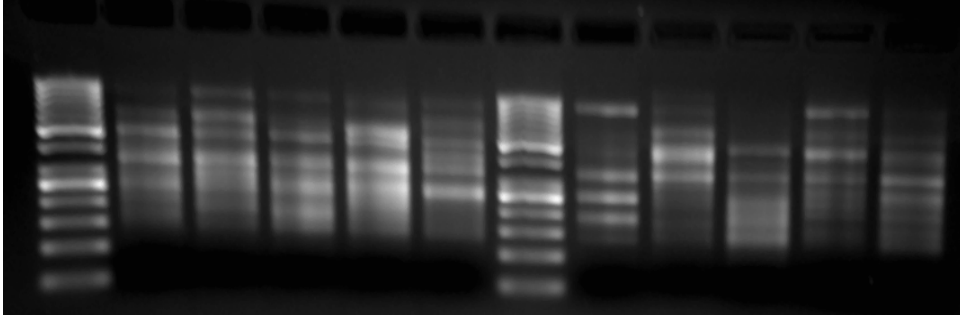


Şekil 9. Hastane infeksiyonuna yol açan VRE izolatlarının PFGE ile elde edilen jel görüntüsü



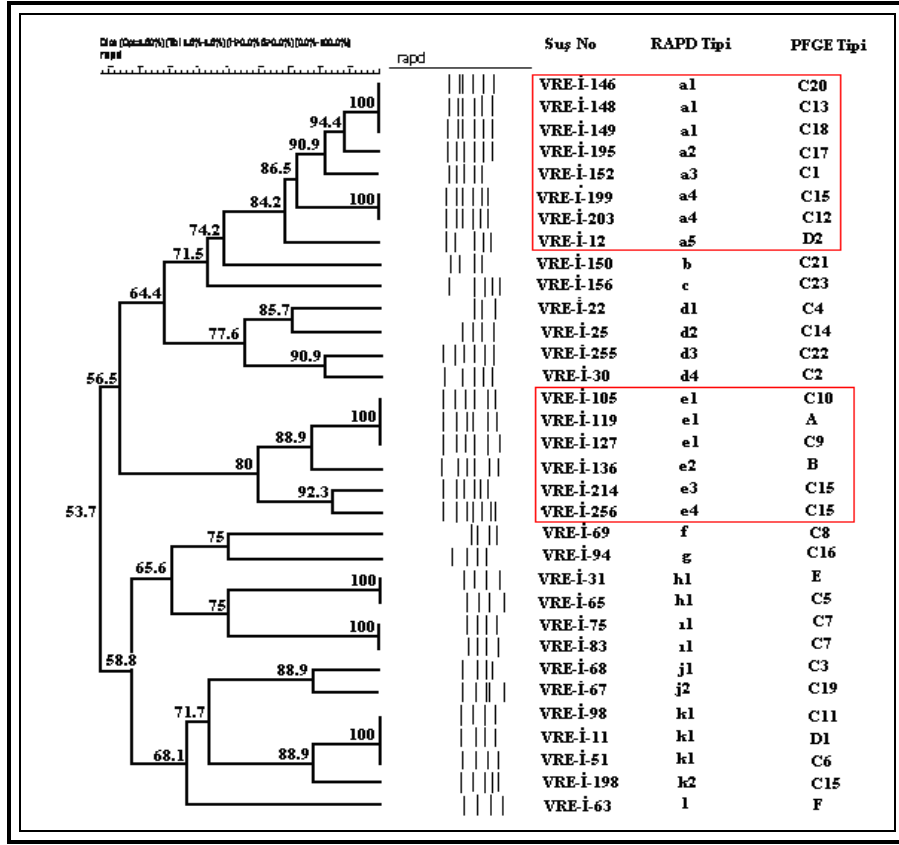
Şekil 10. Hastane infeksiyonuna yol açan VRE izolatlarının PFGE ile elde edilen dendrogramı

Hastane enfeksiyonu tanılı hastalara ait klinik materyallerden izole edilen bu 33 suşu ait genomik DNA örneklerinin klonal ilişkiyi tespit için kullanılan bir diğer moleküler epidemiyolojik yöntem olan RAPD yöntemi ile amplifikasyonu sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 50-1000 bp arasında değişen 4-8 polimorfik DNA bandı elde edildi(Şekil 11). “a-l” olarak adlandırılan 12 farklı gen kümesi içerisinde, en fazla üyeye sahip olan “a” kümesi içerisinde 8 izolatin yer aldığı, bunu 6 izolattan oluşan “e” kümesinin izlediği görüldü(Şekil 12).



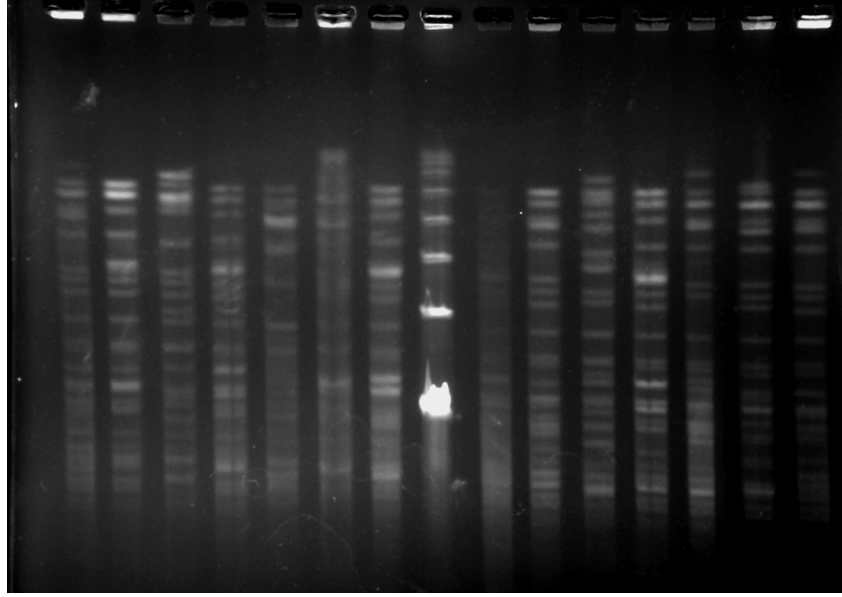
Şekil 11. Hastane enfeksiyonuna yol açan VRE izolatlarının RAPD ile elde edilen jel görüntüsü

Randomly Amplified Polimorfik DNA yöntemi ile elde edilen gen kümelerinin PFGE ile elde edilen gen kümeleri ile karşılaştırılması sonucu gen kümeleri arasında anlamlı bir benzerlik olmadığı tespit edildi. Diğer taraftan fenotipik yöntemlerle *E.avium* olarak tanımlanan ve PFGE tiplendirmesinde tek üyeli özel “E” kümesini oluşturan izolatın (VRE-İ-31) RAPD yöntemi ile yapılan gen kümelendirmesinde PFGE ile “C5” olarak tanımlanan *E.faecium* izolatı(VRE-İ-65) ile de % 100 benzer bulunduğu görüldü.

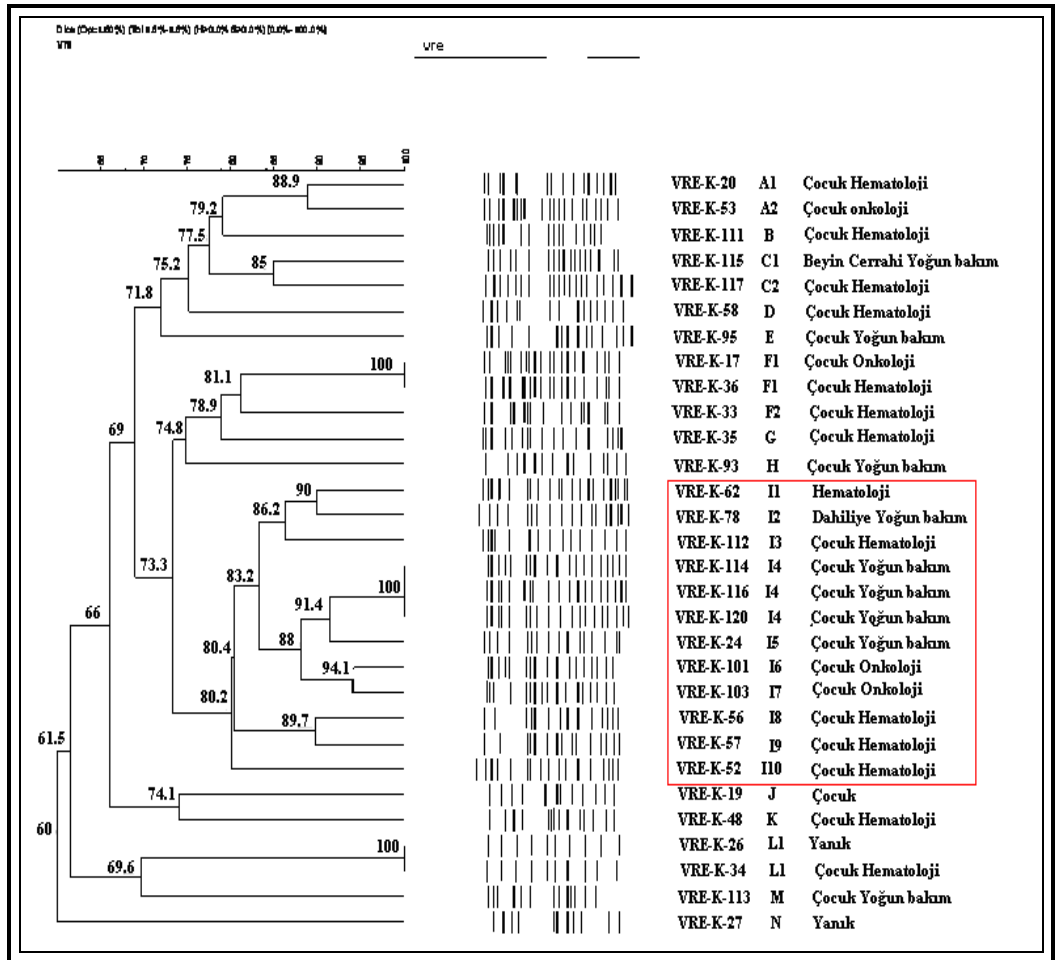


Şekil 12. Hastane infeksiyonuna yol açan VRE izolatlarının RAPD ile elde edilen dendrogramı

e- Endojen kolonizasyona yol açan ve perirektal sürüntü örneklerinden izole edilen 30 izolat genomunun PFGE ile incelenmesi sonucu, büyüklükleri 10-500 kb arasında değişen en az 15 band verdikleri (Şekil 13), bu band özelliklerine göre de izolatların “A-N” olarak adlandırılan 14 farklı klonal küme içerisinde toplandıkları görüldü (Şekil 14). En büyük kümeyi dokuz subtip ve 12 izolata sahip olan “I” kümesi oluşturdu. Bunu, üç üyeli “F”, iki üyeli “A”, “C” ve “L” kümeleri izledi. Major kümeyi oluşturan I kümesinde yakın ilişkili 12 izolatın, 4’ünün Çocuk Yoğun bakım, 4’ünde çocuk hematoloji kliniklerinde yatan hastaların örneklerinden izole edildiği belirlendi. Ayrıca F kümesinde yer alan, Çocuk onkoloji ve Çocuk Hematoloji kliniğinden iki izolatın (VRE-K-17 ve VRE-K-36); Çocuk Yoğun bakım kliniğinden izole edilen üç izolatın (VRE-K-114, VRE-K-116, VRE-K-120) ve Yanık ve Çocuk hematoloji kliniğinden izole edilen iki suşun (VRE-K-26, VRE-K-34) bant profillerinin %100 benzerlik gösterdiği tespit edildi.



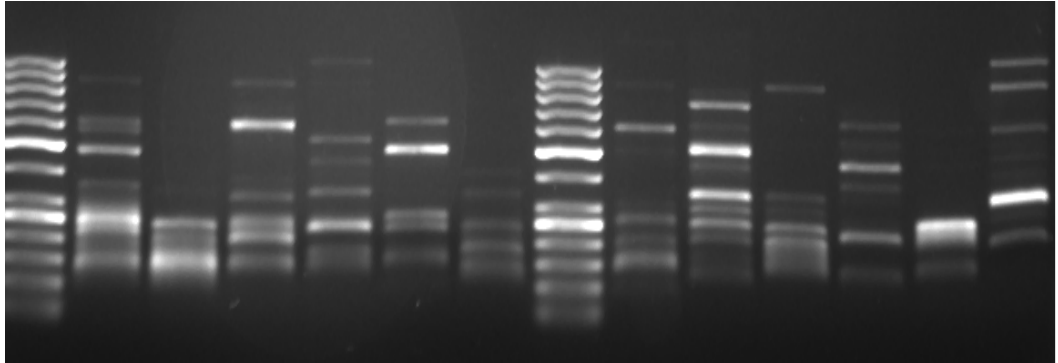
Şekil 13. Kolonizasyona yol açan izolatların PFGE ile elde edilen jel görüntüsü



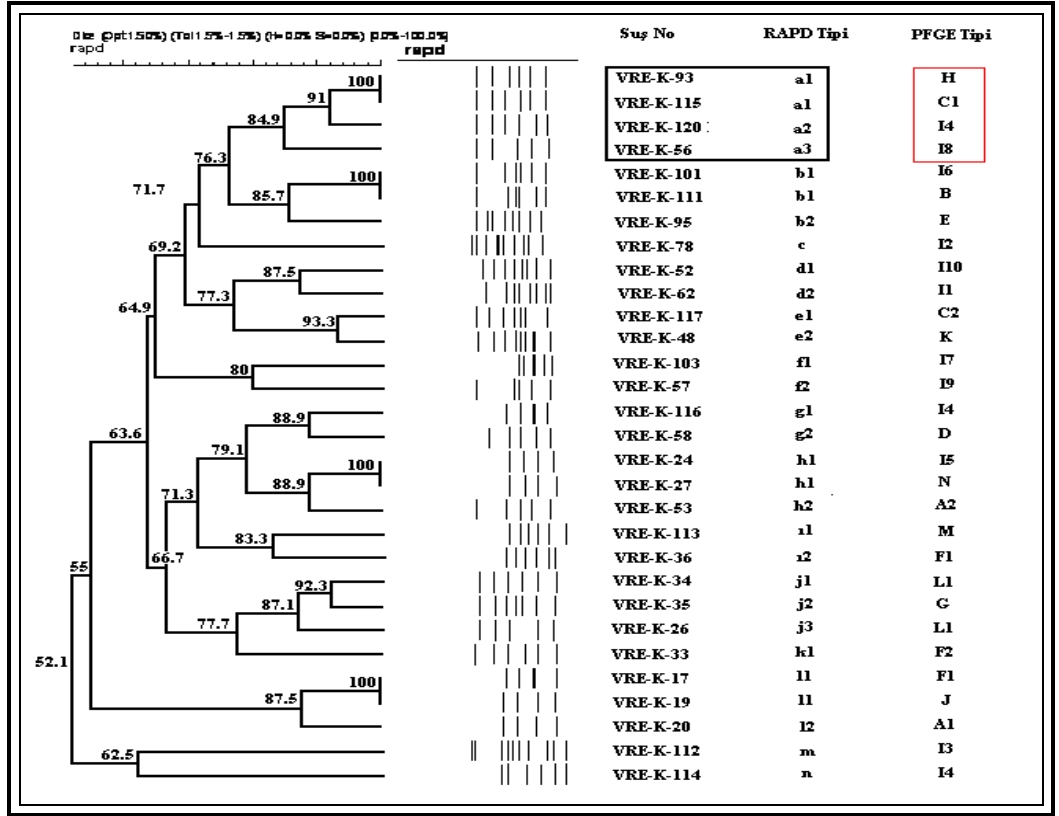
Şekil 14. Kolonizasyona yol açan izolatların PFGE ile elde edilen dendrogramı

Kolonizasyona yol açan 30 izolatın RAPD ile genotiplendirilmesi sonucu da molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 50-1000 bp arasında değişen en az 4-10 polimorfik DNA bandı elde edildiği (Şekil 15), band polimorfizmine göre de izolatların “a-n” olarak isimlendirilen 14 farklı gen kümesi içerisinde yer aldıkları görüldü. En büyük kümenin 4 üyeli olan ve “a” kümesi olarak adlandırılan küme olduğu, bunu 3 üyeli “b, h, l ve j” kümelerinin izlediği tespit edildi(Şekil 16).

“a” kümesi içerisindeki 4 izolatın, PFGE kalıplarına göre farklı kümeler içerisinde yer aldıkları, buna karşılık PFGE ile %100 bant profil benzerliği gösteren ve aynı küme içerisinde yer alan VRE-K-17 ve VRE-K- 36 ile VRE-K-114, VRE-K-116 ve VRE-K-120 izolatlarının da RAPD ile farklı kümeler içerisinde bulundukları görüldü. Ancak PFGE ile ayırt edilemez bulunan ve % 100 band benzerliği gösteren VRE-K-26 ve VRE-K-34 suşlarının RAPD ile de aynı küme içerisinde yer aldığı tespit edildi(Şekil 16).

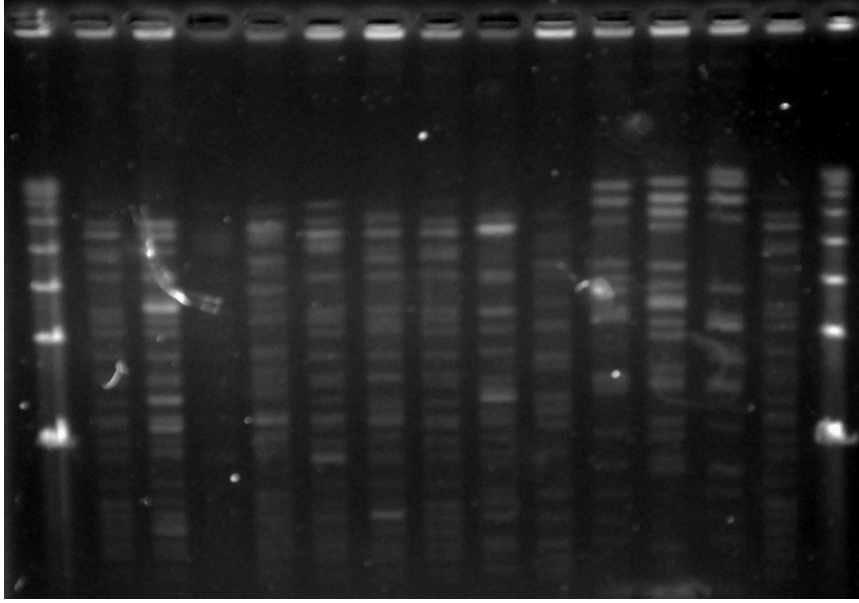


Şekil 15. Kolonizasyona yol açan izolatların RAPD ile elde edilen jel görüntüsü

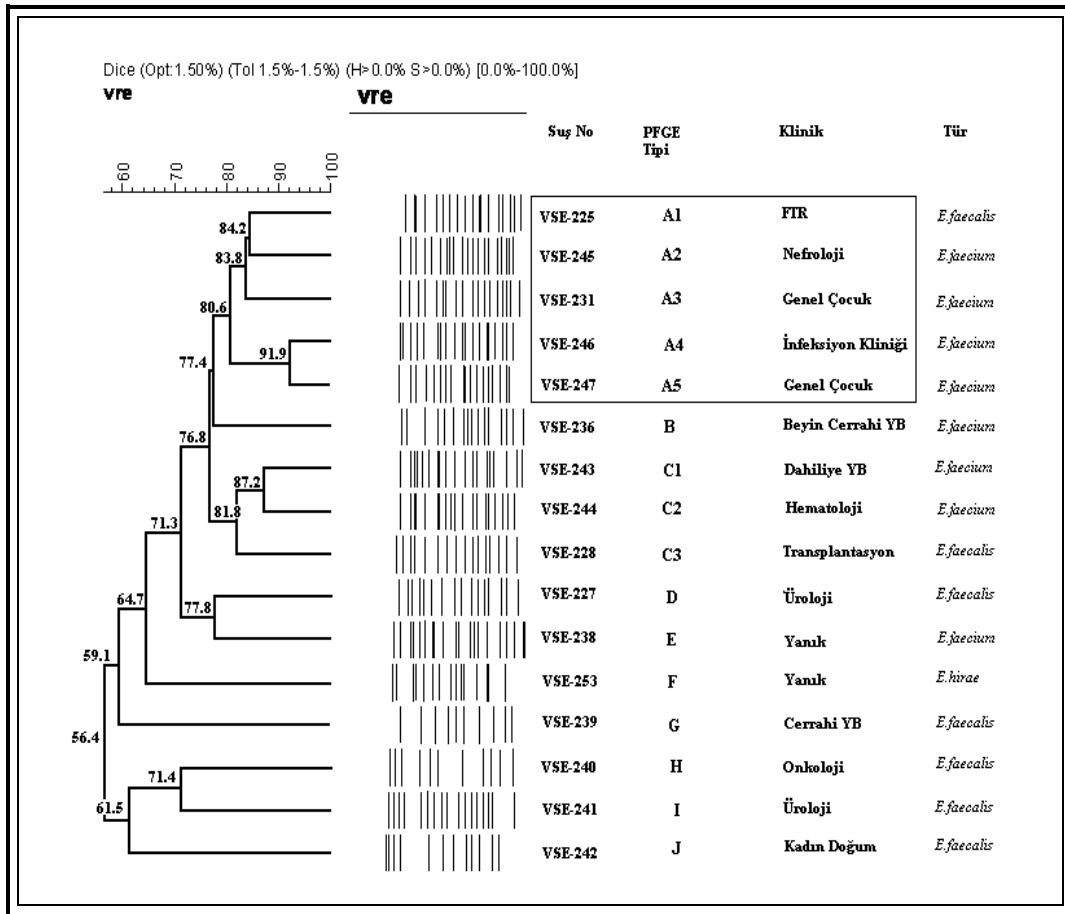


Şekil 16. Kolonizasyona yol açan izolatların RAPD ile elde edilen dendrogramı

f- Hastane enfeksiyonu olmayan ancak klinik yakınmaları olup klinik ve polikliniklerde takip edilen hastalara ait örneklerden izole edilen 16 VSE suşunun PFGE ile tiplendirilmesinde yine büyüklükleri 10-500 kb arasında değişen yaklaşık olarak 16 bant elde edildi(Şekil 17) ve bant paternlerinin dendrogramının yapılması sonucu on değişik PFGE tipi oluşturdıkları gözlemlendi(A-J). Major kümenin beş üyeli “A” kümesi olarak tanımlanan gen kümesi olduğu, bunu üç üyeli “C”kümesinin izlediği belirlendi. Kalan sekiz izolatın ise ilişkisiz izolatlar olduğu görüldü (Şekil 18).

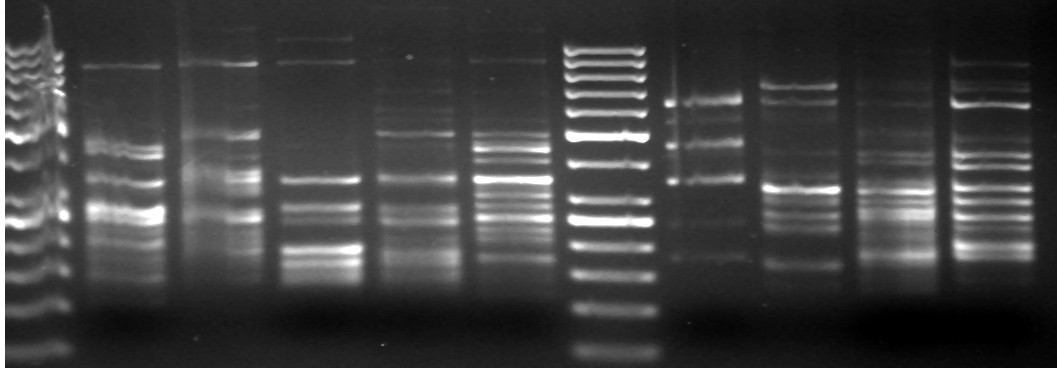


Şekil 17. VSE izolatlarının PFGE ile elde edilen jel görüntüsü

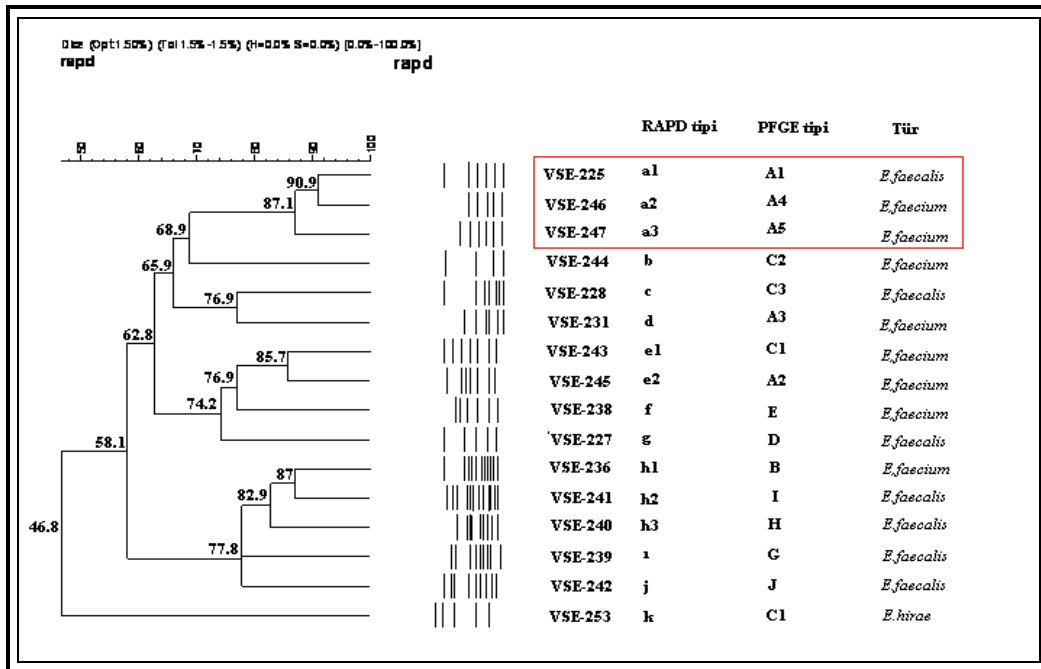


Şekil 18. VSE izolatlarının PFGE ile elde edilen dendrogramı

Randomly Amplified Polimorfik DNA yöntemi ile incelenen 16 VSE suşunun molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 50-1000 bp arasında değişen en az 5-10 polimorfik DNA bandı elde edildiği (Şekil 19), GelComparII programı ile elde edilen dendrogramına göre “a-k” olarak adlandırılan 11 RAPD kümesi oluşturdıkları gözlemlendi (Şekil 20). “a” ve “h” kümelerinde 3'er izolatın yer aldığı bunu 2 üyeli “e” kümesinin izlediği, diğer 8 kümede ise birer üyenin yer aldığı görülmüştür. “a” kümesinde yer alan 3 izolatın PFGE ile de tek küme içerisinde yer aldığı ancak “h” kümesi içerisinde yer alan 3 izolatın PFGE ile yapılan tiplendirilmesinde 3 farklı gen kümesi içerisinde yer aldıkları görülmüştür (Şekil 20).

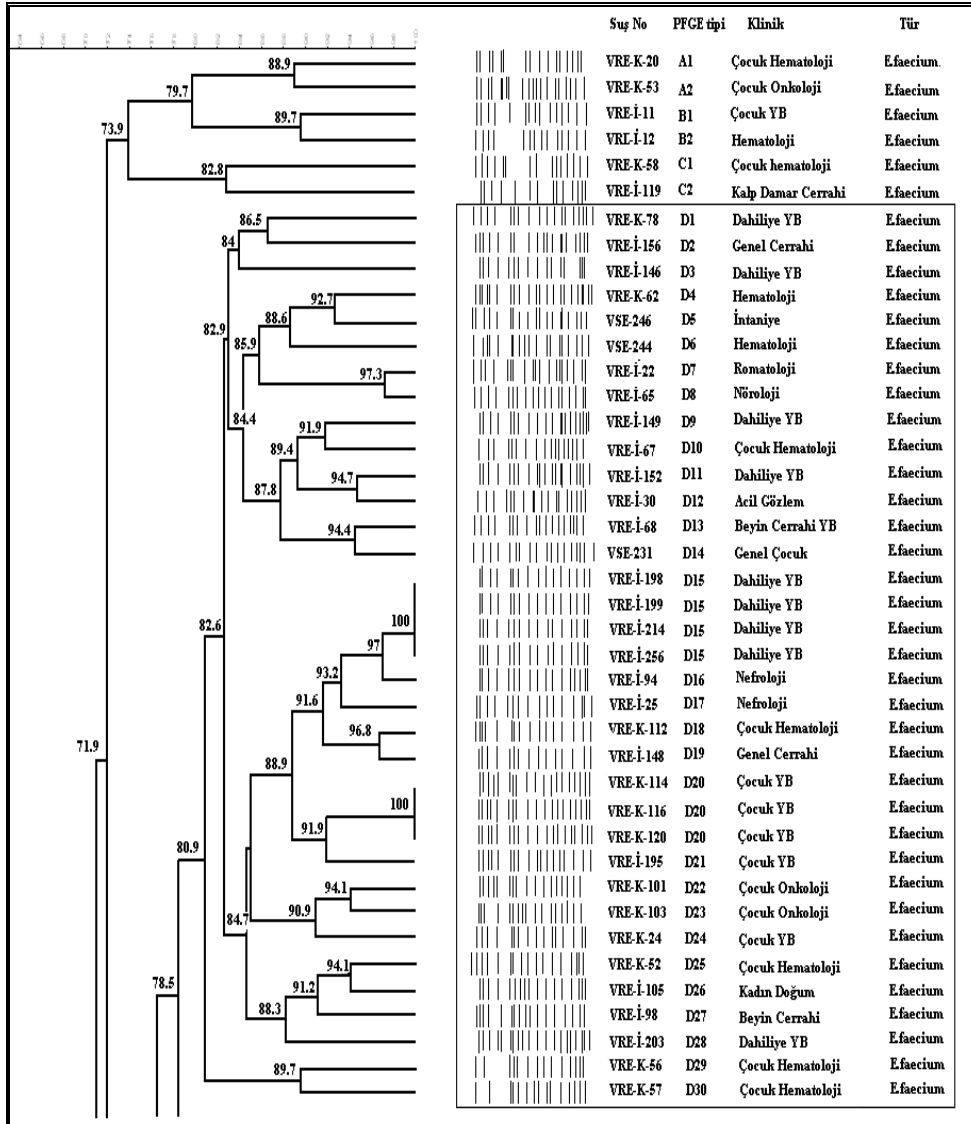


Şekil 19. VSE izolatlarının RAPD ile elde edilen jel görüntüsü

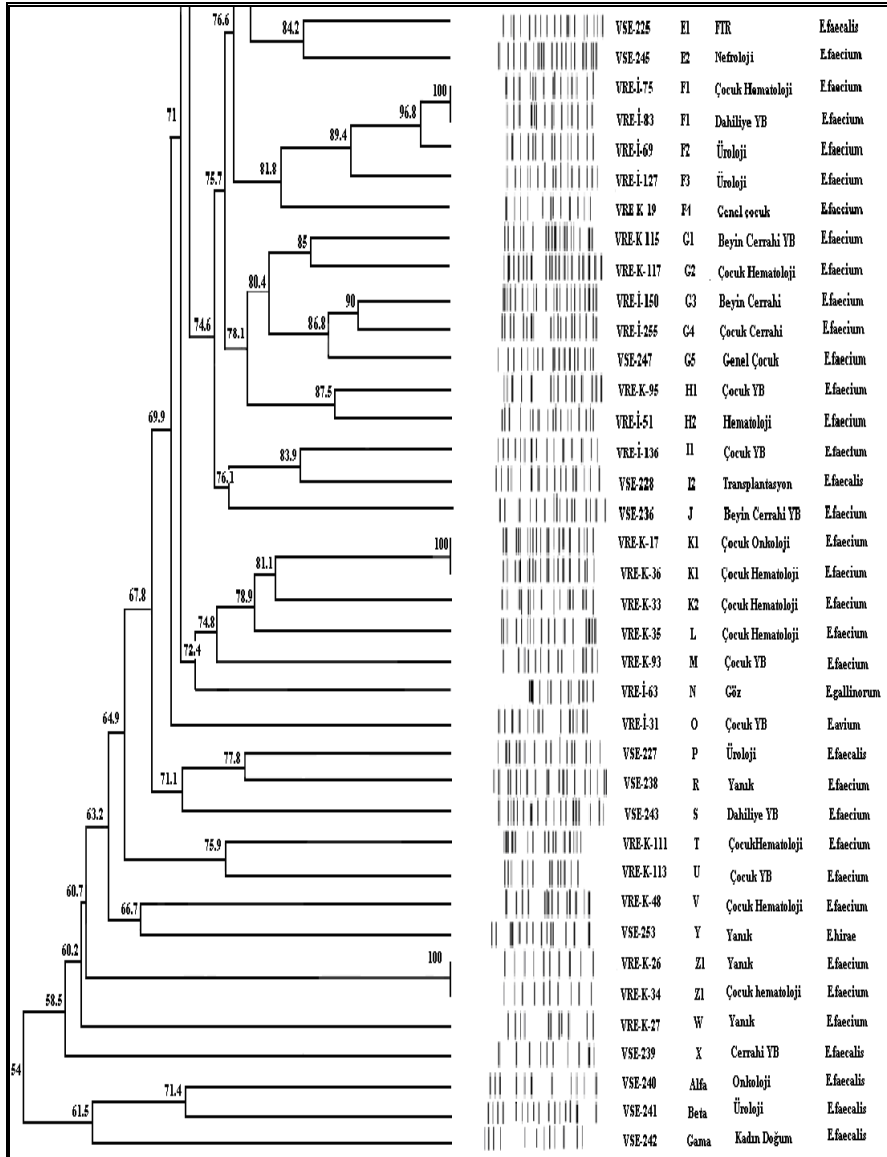


Şekil 20. VSE izolatlarının RAPD ile elde edilen dendrogramı

g-Çalışmaya dahil edilen 79 enterokok suşunun PFGE sonuçlarının bir arada değerlendirilmesi sonucunda; suşların 28 küme içerisine dağıldıkları, en büyük kümenin 35 (%44,3) izolattan oluşan “D” kümesi olduğu, bu izolatların da 20 (%57,14)’sinin hastane enfeksiyonuna, 12 (%34,28)’sinin kolonizasyona yol açan VRE ve 3 (%8,57)’ünün VSE olduğu gözlemlendi. Hastane enfeksiyonu kökenli izolatlar ile kolonizasyon suşlarının bu küme içerisindeki ilişkisi %60 (12/20) olarak tespit edilirken, hastane kökenli olmayan suşlar ile hastane enfeksiyonuna yol açan suşlar arasındaki ilişki %15 (3/20) olduğu görüldü(Şekil 21-21’in devamı).



Şekil 21. Enterokok izolatlarının PFGE ile elde edilen dendrogramı



Şekil 21'in devamı. Enterokok izolatlarının PFGE ile elde edilen dendrogramı

5-TARTIŞMA

Birçok antibiyotiğe karşı gerek intrinsik gerekse kazanılmış direnç göstererek sınırlı tedavi seçeneğine sahip olan, özellikle glikopeptid grubu antibiyotiklere direnci mobil genetik elementlerle diğer bakterilere kolaylıkla transfer edebilen ve intestinal florada asemptomatik persistent kolonizasyon göstererek endojen kökenli enfeksiyonlara da yol açabilen enterokokların, hastane enfeksiyonlarında ki önemi giderek artmaktadır. Avrupa ülkelerinde 1988 yılında, ABD’de de 1989 yılından itibaren bildirilmeye başlanan, daha sonra bir çok ülkeden bildirilen, gerek hastane gerekse toplum kökenli VRE/GRE suşlarında direncin kaynağı ve mekanizması ile bu suşlarla oluşan enfeksiyonların epidemiyolojik özellikleri ve önlenmesine yönelik farklı ülkelerde çok sayıda çalışma yapılmıştır^{55,56}. Bu çalışmalarda enterokoklarda görülen glikopeptid grubu antibiyotiklere karşı direncin mekanizması ve sorumlusu transfer edilebilir genetik elemanlar ve kromozomal mutasyonlar büyük ölçüde tanımlanmış, toplum ve hastane kökenli VRE’lerde direncin kaynağı belirlenmiştir. Hastanelerde bulaşın ve direnç yayılımının engellenmesine yönelik düzenlenen rehberlere rağmen, özellikle yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalar arasında VRE’lerin sebep olduğu hastane enfeksiyonlarının insidansındaki artış engellenememiştir.

Bizim Eylül 2009-Nisan 2010 tarihleri arasında kalan 8 aylık periyod içerisinde hastane enfeksiyonu tanısı almış 33 yatan hasta ile kolonizasyonu kontrol amacı ile perirektal sürüntü örneklerinden izole edilen 30 VRE izolatımız, hastanemizde VRE’nin mevcudiyetini gösterirken, hastane enfeksiyonu tanımına uymayan, çoğu poliklinikten takip edilen 16 hastaya ait klinik örneklerden izole edilen suşların tamamının VSE olması da, VRE’nin toplumda ya bulunmadığı veya çok düşük oranlarda görülebileceğini göstermektedir.

Enterokok türleri arasında klinik öneme sahip olan VRE’ların tür dağılımı da, enfeksiyonun lokalizasyonu, hastanın takip edildiği servis, hastanede antibiyotik kullanım politikalarına bağlı olmak üzere hastaneler ve bölgeler arasında değişiklikler

göstermektedir. Ancak tüm dünyada gerek hastane enfeksiyonları gerekse kolonizasyonla ilgili olarak izole edilen VRE türleri arasında *E.faecium* oranının giderek arttığı dikkat çekmektedir. Nitekim bizim gerek hastane enfeksiyonu gerekse kolonizasyon ile ilişkili izolatlar arasındaki tür dağılımına ait bulgularımızda bu beklenti ile paralellik göstermektedir. Ancak gerek antibiyotik duyarlılık kalıpları gerekse direncin bir tür içerisinde hızlı yayılımı epidemiyolojik sürveyansda salgın ve kontrol için istenen ayırım gücüne sahip sonuçlar veremez. Bununla birlikte VRE izolatları arasında teikoplanin ve diğer glikopeptit türevi yeni antibiyotiklere karşı değişen oranlarda direnç gelişiminin görülmesi epidemiyolojik yönden tartışmaya değer bulunmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle bakteriyemiye yol açan *E.faecium* izolatları arasında VRE oranının (%19), *E.faecalis* izolatları arasındaki VRE oranına (%4) göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. ABD’de yapılan bir long-term epidemiyolojik çalışmada; 1995-2002 yılları arasında izole edilen VRE izolatları diğer glikopeptid türevi antibiyotiklere direnç oranları ve türler arasındaki farklılıkların tespiti amacı ile değerlendirilmiş ve *E. faecium* suşlarında, tüm glikopeptit türevlerine karşı *E. faecalis*’e oranla çok belirgin bir direnç artışı tespit edilmiştir¹²⁵. Kanada’da üriner sistem enfeksiyonları ve bakteriyemilerden izole edilen VRE lerin %98,3’ünün *E.faecium*, % 1,7 sininde *E.faecalis* olduğu bildirilmiştir¹²⁶.

Brezilya’da Pedro Alves D’azevedo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 81 hastanın fekal sürveyans kültürlerinde, tamamı vankomisin ve teikoplanine dirençli, 37 VRE suşu izole edilmiş ve bunların 20 (%54,05)’si *E.faecium* ve 17(%45,94)’si *E.faecalis* olarak tanımlanmıştır¹²⁷. Ülkemizde Ankara ve İstanbul’da yapılan çalışmalarda 467 hastanın %1,9’unda VRE kolonizasyonu belirlenmiş ve bunların tamamının vankomisin ve teikoplanine dirençli *E.faecium* olduğu bildirilmiştir¹²⁸. Biz çalışmamızda değerlendirdiğimiz 79 izolatın 69 (%87,34)’ünün *E.faecium*, 7 (% 8,86)’sinin de *E.faecalis* olduğunu tespit ettik (Tablo.10). İzolatlarımız arasında yer alan 33 hastane kökenli enfeksiyon suşunun 31 (%93,4)’i ile perirektal bölgeden izole edilen 30 enterokok suşumuzun tamamı VRE ve *E.faecium*’du (Tablo 11). Genel olarak tüm dünyada VRE izolatları arasında görülen VR. *E.faecium* suşlarındaki artış trendi bölgemiz içinde benzer bulunmuştur. Ayrıca hastane kökenli enfeksiyonlardan izole ettiğimiz 31 VR. *E.faecium* suşunun 29(%93,5)’u ile

kolonizasyonla ilişkili 30 izolatın 24(%80)'ünün teikoplanin'e dirençli olduğunu gördük (Tablo 12).

Vankomisin dirençli enterokok epidemiyolojisi açısından, özellikle direncin kaynağı yönünden Avrupa'dan farklılık gösteren ABD'de, VRE/GRE kaynağı hastanelerdir. ABD ve Kanada'da 28 hastaneden hastane kökenli üriner sistem enfeksiyonu ile ilişkili olarak toplanan 283 VRE izolatının teikoplanin direnci yönünden değerlendirildiği bir çalışmada, izolatlar arasında Teikoplanin direncinin % 78,7 oranında görüldüğü tespit edilmiştir¹²⁹.

Bizim hastane enfeksiyonu ile ilişkili olan 33 izolatımızdan ikisi *E.faecium* dışı izolatlar olup, fenotipik karakterlere göre yapılan bunlardan birisi *E.gallinorum* biriside *E.avium* olarak tanımlanmıştır ve bunlardan *E.gallinorum* suşunun da teikoplanin'e duyarlı olduğu görülmüştür. Bu açıdan değerlendirildiğinde hastane enfeksiyonu ile ilişkilendirilen VRE izolatlarımız arasında teikoplanin direnç oranı %91 (30/33) dir. Bizim, VRE'lerin her üç gruba ait tür dağılımına ilişkin bulgularımız, benzer çalışmayı yapan Pedro Alves D'azevedo'nın sonuçlarına kısmen uymamakla birlikte; hem vankomisin direnci hemde tür dağılımı yönünden, VRE izolatlarının tamamını *E.faecium* olarak bildiren, kolonizasyonla ilişkili suşlarla çalışan, Aygün H. ve arkadaşlarının bulguları ile tamamen uyumludur^{127,128}.

Diğer taraftan hastane enfeksiyonu dışı klinik örneklerden izole ettiğimiz 16 enterokok izolatı arasında 8 (%50) suş *E.faecium*, 7(%43,75) suş ise *E faecalis*'di ve suşların tamamı vankomisin'e duyarlı (VSE) bulundu.

Bu bulgularımız, toplumda *E.faecium*'un, *E.faecalis* kadar sık görüldüğünü, toplum kökenli enterokok enfeksiyonlarından izole edilen suşlarımız arasında VRE olmamasının (Tablo 12), toplumun epidemiyolojik özellikler açısından, intestinal VRE taşıyıcılık oranı %2-12 olarak bildirilen Avrupa ülkelerinden ziyade, toplumda VRE taşıyıcılığı bildirilmeyen ABD ile örtüştüğünü göstermektedir. Yine, VRE izolatlarımız arasında teikoplanine direnç oranlarımızın ABD ve Kanada'nın sonuçlarına göre biraz daha yüksek olmasına rağmen, ABD'de olduğu gibi bizde de korunma ve kontrol programlarının yetersizliği sebebi ile hastanelerdeki VR *E.faecium*'un hakimiyetinin arttığını ortaya koymaktadır. Ancak hastane kökenli VR. *E.faecium* ve diğer VRE salgınlarının epidemiyolojik özelliklerinin tespiti için salgınlarda izole edilen izolatların tür ve direnç tayinlerinden sonra, mutlaka moleküler epidemiyolojik yöntemlerle tür içi

izolatlar arasındaki klonal ilişkinin gösterilmesi, varsa atasal ve ilişkili suşların genotipik yöntemlerle belirlenmesi gereklidir.

Günümüze kadar özellikle VRE salgınlarının epidemiyolojik özelliklerinin tespitinde, fenotipik yöntemlerin dışında, farklı moleküler epidemiyolojik yöntemler denenmiş, tekrarlanabilirlik, yüksek ayırım gücü ve kantite edilebilir sonuçlar üretmesi sebebi ile diğer birçok önemli bakteriyel ajanda olduğu gibi PFGE yöntemi “altın standart” olarak kabul edilmiş, diğer testler PFGE yöntemine göre derecelendirilmiştir. Bu yöntem farklı bakterilerle oluşan hastane enfeksiyonları salgınlarında, özellikle kısa süreli salgınlarda, salgın suşları ve kaynak tespitinde son derece yararlı bulunmuştur. Ancak VRE salgınlarında, PFGE ile yapılan çalışmaların salgınların önlenmesinde yararlı olabileceğini ileri süren yayınların yanı sıra, mutasyonlara son derece açık olup, toplumda geniş bir kolonizasyon oranına sahip olan enterokokların klonalitesini tespit, özellikle salgınlar ve klonlar arasındaki ilişkinin tespitinde PFGE yönteminin istenen duyarlılıkta, kullanılabilir sonuçlar üretmediğini söyleyen yayınlarda yapılmıştır.

Mesela, Alejandra C. Corso ve arkadaşlarının(2007), Arjantin’de 1997-2000 yılları arasında 30 hastaneden elde edilen 189 VR. *E.faecium* izolatının glikopeptit direnç mekanizmalarını karakterize etmek ve genetik ilişkilerini PFGE yöntemi ile göstermek amacıyla yaptıkları çalışmada; izolatların PFGE ile 35 klonal gen kümesi içerisine dağıldıkları, bunların 106 (%56)’sının Tip1 olarak tanımlanan klonal kümede yer aldıkları gösterilmiştir. Bu küme içerisinde 24 alt kümenin olduğu tespit edilmiştir. Tip1 grubunda yer alan izolatlar, örnek toplanan 30 hastanenin 19’unda bulunmuş ve 17 hastane de baskın suş olduğu belirlenmiştir. Farklı şehirlerde, farklı hastanelerde ve aynı hastanenin farklı servislerinde bulunan Tip1 klonu hastanelere yerleşik suş olarak kabul edilmiştir. Bu grup özel bir klondaki subtiplerin sayısının bir bölgedeki klonun evrimini ve muhtemel yaşını gösterebileceğini ileri sürerek yöntemin hem kısa (short term) hemde uzun soluklu (long term) sürveyans çalışmaları için kullanılabilir sonuçlar ürettiğini ileri sürmüşlerdir. Bu grup band sayılarındaki minor değişiklikleri plazmid, transpozon ve IS elementleri gibi çeşitli mobil genetik elementlerin kazanımı veya kaybı kadar mutasyonlar ve rearrangement gibi olaylara bağlamışlar ve muhtemelen bir epidemik bir klonun uzun süredir hastanelere hakim olabildiğini ileri sürmüşlerdir¹³⁰.

Yine Pedro Alves D’azevedo ve arkadaşları tarafından, Brezilya’da bir eğitim hastanesinin yoğun bakım ünitelerinde tedavi edilen hastaların sürveyans kültürlerinde

izole edilen 38 VRE'nin incelendiği bir çalışmada suşların ampicilin, vankomisin, teikoplanin, gentamisin ve streptomisin'e duyarlılıkları ile PFGE profilleri araştırılmıştır. Bu çalışmada, 81 dışkı örneğinin 20'sinde *E.faecium* ve 17'sinde de *E.faecalis* olmak üzere 37 sinde VRE izole edildiği, izolatların tamamının Vankomisin ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençli bulunduğu bildirilmiştir. PFGE ile genotipleme için her yoğun bakım servisinde 2 izolatın tesadüfi olarak seçildiği çalışmada; *E. faecalis* izolatlarının 2, *E.faecium* izolatlarının da 5 farklı klonal küme içerisinde toplandığı belirtilmiştir. Araştırmacılar aynı klonal küme içerisinde yer alan *E.faecium* izolatlarının, 4 farklı yoğun bakım kliniğinde takip edilen 4 farklı hastadan izole edildiğini bildirmişler ve bu klonun sekiz yıl önce tespit ettikleri ilk VRE klonundan farklı olduğunu belirterek, hastaneye yeni bir VR. *E.faecium* klonunun yerleştiğini ispatlamışlardır. Bu sonucun, PFGE yönteminin short-term kadar long-term sürveyans için de önemini gösterdiğini vurgulamışlardır¹²⁷.

Vincent CC Cheng ve arkadaşlarının (2009), Hong kong'ta bir hastanenin beyin cerrahi kliniğinde bir aylık periyotta görülen VR. *E.faecium* salgınını araştırdıkları çalışmada; 211 hastadan alınan 193 klinik örnek ile 516 çevresel örneği taranmışlardır. Çalışmada indeks vaka izolatı ile ilişkili PFGE kalıbı veren, 3'ü klinik, 2'si de çevresel örneklerden olmak üzere 5 suş izole edilmiştir. Bu suşlar dışında da örneklerden başka VR. *E.faecium* izole edilememiştir. Bulaş oranındaki düşüklük bu servis de VRE'ye karşı alınan hijyen tedbirlerine bağlanmış ve PFGE ile klonal ilişkilendirmenin salgın sürveyansı için önemini vurgulamışlardır¹³¹.

Rusya'da (2010) Anna N. Brilliantova ve arkadaşları tarafından yapılan ve hematolojik malignitesi olan hastalardan izole edilen VR *E.faecium* izolatlarının klonal çeşitliliğinin PFGE yöntemi ile değerlendirildiği bir çalışmada ise; 129 *VanA* pozitif *E.faecium* suşunun PFGE yöntemi ile 23 farklı gen kümesi (A-W) içerisine dağıldığı gösterilmiştir. Bu araştırmacılar en geniş gen kümelerinin, 30 üyeli A (A1-A30) ile 8 üyeli F(F1-F8) kümeleri olduğunu bildirmişler ve PFGE yönteminin VRE sürveyansındaki önemini vurgulamışlardır¹³².

İspanya'da S. Valdezate ve arkadaşlarının (2009), PFGE, MLVA ve MLST yöntemleri kullanılarak, 10'u hastane enfeksiyonlu, 40'ı da kolonizasyonla ilişkili örneklerden olmak üzere toplam 50 VR. *E.faecium* izolatını klonal ilişki yönünden değerlendirdikleri çalışmalarında; bütün izolatların 3'ü büyük "ana küme" olmak üzere

8 PFGE kümesi içerisinde toplandığı belirtilmiştir. Bu 3 major kümeden Tip1'in ilk izole edilen indeks suş ile ilişkili suşları içerdiği ve 2 yıl boyunca 3 servisten izole edilen 37 (%74) izolattan oluştuğu bildirilmiştir. Tip 6'nın, 101 gün içerisinde 2 servisteki toplam 5 hastadan izole edildiği ve Tip 7'nin de 7 günlük peryotta aynı servisteki 2 hastadan izole edildiği belirtilmiştir. Bu grup PFGE yöntemi ile belirlenen grupların hem short term hemde long term için son derece önemli sonuçlar ürettiğini göstermişlerdir¹³³.

M. Abelehorn ve arkadaşları ise (2006) Almanya'da, 2000 ve 2004 yılları arasındaki 4 yıllık bir peryotta izole edilmiş, kolonizasyon veya enfeksiyonla ilişkili 24 *VR. E.faecium* izolatını MLST, MLVA ve PFGE ile klonal ilişki yönünden değerlendirdikleri çalışmalarının sonucunda: MLST ile 7 ST tipi, MLVA ile 6 MT tipi, MLST ve MLVA kombinasyonu ile 9 farklı ST/MT tipi elde etmişlerdir. PFGE ile yaptıkları kümelendirmede ise üçü birden çok üyeli olmak üzere 13 gen kümesi elde etmişler ve sonuç olarak hastane enfeksiyonlarından sorumlu VRE sürveyansında ancak MLST ve MLVA kombinasyonunun PFGE'e alternatif olabileceğini ileri sürmüşlerdir¹³⁴.

PFGE ve MLST yöntemlerinin sürveyansdaki önemlerini karşılaştırmak amacı ile X. Zhu ve arkadaşları (2009) tarafından Pekin'de yapılan bir çalışmada ise; yaklaşık olarak 8 aylık periyotta YBÜ de takip edilen 14 hastadan izole edilen 18 *VR. E.faecium* izolatı değerlendirilmiştir. İzolatların PFGE ile incelenmesi sonucunda 14 farklı gen kümesi elde edilmiş, bir kümedeki 4 suş ve bir başka kümedeki 2 suş klonal yönden kendi içlerinde % 100 uyumlu bulunurken, kalan 12 suşun tamamen farklı ve özel kümeler oluşturdukları yani birbirleri ile ilişkisiz oldukları belirlenmiştir. Buna karşılık MLST ile sekiz sekans tipi elde edildiği bildirilmiştir. Yani MLST'nin ayırım gücü PFGE'in ayırım gücüne göre daha düşük bulunmuştur¹³⁵.

Stampone L ve arkadaşlarının, 2001-2003 yılları arasında İtalya'da farklı bölgelerdeki 19 hastanede yatarak tedavi gören hastalardan alınan kan kültürlerinden izole ettikleri 31'i *E.faecium*, 8'i de *E.faecalis* olmak üzere 39 VRE izolatını klonal ilişki yönünden PFGE ve MLST yöntemleri ile değerlendirdikleri çalışmaların da; 31 *E.faecium* izolatının 28'inin PFGE ile benzer bant profili verdiklerini tespit etmişler ve bu kümeyi Tip1 olarak isimlendirmişlerdir. Bu grup, İtalya'daki bakteriyemilerden izole edilen VRE'lerin, uluslararası yayılımı olan, hastane ortamına adapte olmuş çoklu ilaç

direnci gösteren bir VR *E.faecium* klonu olduğunu bildirilmişlerdir. *E.faecium* izolatlarının MLST analizi sonucu ise baskın genotipin CC17 (ST17) olduğunu, bu genotipin Hollanda, İtalya, ABD, Brezilya ve birçok ülkedeki hastane kökenli enfeksiyonlardan sorumlu olan ve genellikle kinolon ve ampisilin direnci gösteren köken olduğunu vurgulamışlardır. Bu grup PFGE yönteminin epidemiyolojik sürveyansda tüm dünyadaki yaygın suşların tespitinde bile anlamlı sonuçlar ürettiğini, ancak hastanelerde persiste eden ve salgın yapan suşlarda *esp* gibi diğer virulans faktörleri ile MLST yöntemi kullanılarak yapılacak analizlerin özellikle de CC17 gen kompleksinin gösterilmesinin önemini vurgulamışlardır¹³⁶.

Benzer bir öneride, Anita Hallgren ve arkadaşlarının İsveç'teki 8 hastanede yaptıkları VRE sürveyans çalışmasından sonra ileri sürülmüştür. Bu grup 21'i *E.faecium* ve 94'ü *E.faecalis* olmak üzere toplam 115 enterokok izolatını PFGE ile değerlendirdikleri çalışmalarında; YBÜ de yatan hastalardan alınan klinik örneklerden izole edilen 70 VR. *E.faecalis* izolatından 47'sinin üç farklı PFGE kümesi içerisinde yer aldığını, kalan 23 izolatın da farklı, tek üyeli özel, PFGE paternlerini gösterdiklerini, bakteriyemili hastalardan toplanan izolatlardan 4 VR. *E.faecium* suşunun da yine tek üyeli 4 farklı PFGE kümesi oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar YBÜ'deki hastaların rektal sürüntülerinden izole edilen 17 VR. *E.faecium* izolatından ise 12'sinin genetik ilişkili 3 farklı kümede toplandığını, en büyük kümenin 8 üyeli, diğer 2 kümenin de 2'şer üyeli olduklarını, kalan 5 izolatın ise birbirleri ile ilişkisiz tek üyeli 5 küme oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu grup hastane enfeksiyonlarından izole edilen VRE'lerin hastanede yatan hastalarda kolonizasyon yeteneğini arttıran, agregasyon faktör-*asaI*, enterokokal yüzey proteini-*esp* ve sitolizin operonundaki 5 genden oluşan sitolizin -*cyl*- gibi önemli 3 virulans faktörüne sahip olduklarını, PFGE kalıplarının bu virulans faktörlerinin varlığı ile birlikte değerlendirilmesinin gerektiğini belirtmişlerdir¹³⁷.

Buna karşılık Kimberly A.Nichol ve arkadaşlarının, ABD ve Kanada'daki 38 hastaneden toplanan 283 üriner VRE izolatının, vankomisin, teikoplanin direncinin yanı sıra, klonaliteye dayalı epidemiyolojik özelliklerinin PFGE ile araştırıldığı çalışmasında, izolatlar arasında genetik heterojenite olduğu, hastane içi ve hastaneler arası VRE yayılımındaki artışa rağmen baskın bir klonal suşun tespit edilemediği bildirilmiştir. Bu heterojenlik, Kuzey Amerika'da VRE dağılımının, hem glikopeptit

direncinden sorumlu genetik elemanların horizontal transferi hem de poliklonal yayılımını içeren karmaşık bir süreç olmasına bağlanmıştır¹²⁹.

Yine Raffaele Zarrilli ve arkadaşları (2005) İtalya’da yaptıkları ve 68’i *E.faecalis* ve 23’ü de *E.faecium* olmak üzere 91 enterokok izolatını değerlendirdikleri bir çalışma da PFGE yöntemi ile çok sayıda gen kümesi elde ettiklerini bildirerek, izolatlar arasındaki heterojeniteyi endojen barsak mikrobiyotasından sporadik suşlara bağlamışlardır.

Lester ve arkadaşları da Danimarka’da VRE epidemiyolojisi ile ilgili yaptıkları long-term çalışmada 2002-2006 yılları arasındaki periyotta izole ettikleri 84 VR. *E.faecium* izolatını MLST ve PFGE yöntemleri ile değerlendirdikleri çalışmalarında; genel olarak Danimarka’da enterokok enfeksiyonlarında %68 oranında bir artış görüldüğünü, bu artışın özellikle *E.faecium* türünde olduğunu belirtmişler ve klonal ilişki yönünden değerlendirdikleri 84 VR. *E.faecium* suşunun MLST yöntemi ile 10 farklı genotip içerisine dağıldığını, ancak izolatların 82 (%97,6)’sinin CC17 dizisine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Böylece CC17 dizisine sahip genotipin Danimarka’da klinik *E.faecium* izolatları arasında baskın genotip olduğunu ve bu sonucun diğer Avrupa ülkeleri ile de uyumlu olduğunu vurgulamışlardır. Aynı izolatları PFGE ile değerlendiren grup, suşların sekiz major küme içerisine dağıldığını belirlemişlerdir. Bu kümelerden yedisinin spesifik bir ST özelliği gösterdikleri, ancak aynı PFGE kümesi içerisinde tek lokus veya iki lokus varyantların yer alabildiğini tespit edilmişlerdir. Sonuç olarak MLST yönteminin PFGE yöntemine göre daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir¹³⁸.

Biz, PFGE yöntemi ile hastane enfeksiyonu ile ilişkili 33 VRE izolatımızın, en büyüğü 27 üyeli olmak üzere, “A-F” olarak isimlendirdiğimiz 6 küme içerisinde toplandıklarını gördük. (Şekil 9-10). Bizim %100-80 benzerlik oranı ile en çok üyeye sahip olan “C” klonal kümemiz içerisinde yer alan 27 suşun tamamı *E.faecium*’du. Bu kümeyi yine tamamı *E.faecium* izolatlarından oluşan 2 üyeli D kümesi izledi. Tek üyeli A ve B kümelerinde de *E.faecium* izolatları yer alırken, E ve F kümelerinde diğer izolatlarla ve kendi aralarında genetik yakınlık olmayan *E.gallinorum* ve *E.avium* türlerine ait suşlar yer aldı. Farklı türler olan *E.gallinorum* ve *E. avium*’un kendi aralarında ve diğer *E faecium* izolatlarından tamamen farklı PFGE profili sergilemelerine karşılık, kalan 31 VR. *E faecium* izolatından 27’sinin 23 subtip(C₁-C₂₃)

ile bir tek küme (C) içerisinde yer alması, kalan 4 *E.faecium* izolatından 2 sinin tek diğerlerinin ayrı ayrı olmak üzere 3 farklı klonal küme içerisinde yer almaları, PFGE yönteminin, klonal farklılığın yanı sıra, tür farklılığını bile gösterebilen hastane enfeksiyonlarında VRE sürveyansı için kullanılabilir epidemiyolojik sonuçlar yaratabilen, duyarlı ve yüksek ayırım gücüne sahip bir yöntem olduğunu, hastanemizde hastane ortamına egemen olan bir genotipin (C genotipi) varlığını, bu genotipin uzun süredir persiste ettiğini (C_1 - C_{23}), ancak zaman zaman küçük çaplı salgınlara sebep olabilen yeni genotiplerin (A, B ve D) hastaneye girdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgularımız Pedro Alves D'azevedo ve arkadaşları ile S. Valdezate ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttikleri gibi, PFGE yönteminin, hem kısa hemde uzun süreli VRE sürveyansında epidemiyolojik sonuçlar çıkartabilecek yüksek ayırım gücüne sahip bir metod olduğu şeklindeki kanaatleri ile paralellik göstermektedir^{127,133}.

Diğer taraftan, endojen kolonizasyonu tanımlayan perirektal sürüntü örneklerinden izole edilen 30 *E.faecium* izolatının PFGE yöntemi değerlendirilmesi sonucunda “A-N” olarak tanımladığımız 14 küme tespit ettik (Şekil 13-14). Bu kümelerden en çok üyeye sahip olanı 12 üyeli “I” kümesi oldu. Kalan 18 izolatımız biri 3 ($F_{1,2,3}$), üçüde 2’şer üyeli ($A_{1,2}$, $C_{1,2}$ ve $L_{1,2}$), diğer 9 izolatta tek üyeli 9 kümeye dağıldığını gördük. Hastane enfeksiyonu ile ilişkili izolatlarımızın sayısının daha çok olmasına karşılık kolonizasyonla ilişkili izolatlarımıza oranla daha az sayıda fakat anlamlı derecede çok üyeli kümeler içerisinde toplanmaları, yöntemin hastane enfeksiyonlarının sürveyansındaki başarısını göstermektedir. Ancak kolonizasyonla ilişkili izolatlarımız arasında 12 üyeli bir kümenin bulunması ve suşların tamamının VR. *E.faecium* olarak tanımlanması, bu izolatlarında hastane kökenli olabilecekleri ihtimalini akla getirmektedir.

Nitekim hastane enfeksiyonu özelliği taşımayan ancak klinik yakınmaları olup klinik ve polikliniklerde takip edilen hastalara ait klinik örneklerden izole edilen 16 VSE suşunun PFGE ile tiplendirilmesinde küme sayısının 10 (A-J) ve en büyük kümelerin de 5 üyeli “A” ile 3 üyeli “C” kümesi olduğunu tespit ettik (Şekil 17-18). Kalan 8 izolat ise tek üyeli özel kümeler oluşturdu. Bu grupta incelenen ve toplum kökenli enfeksiyonlara yol açan izolatların sayılarının az olmasına karşılık, çok sayıda farklı genetik profil sergilemeleri, toplumda VRE kolonizasyonunun görülmediği veya çok düşük oranlarda olduğu sonucunun yanı sıra, kişinin barsak florasında kolonizasyon

gösteren enterokokların, barsağın mikroçevresinde bilinmeyen çok sayıdaki değişkenin etkisi ile genetik modifikasyona uğrayarak, genotipik çeşitliliği yarattığını düşündürdü. Bu bulgumuz daha önceden bildirilen Raffaele Zarrilli ve arkadaşlarının hipotezi ile de uyumludur¹³⁸.

Çalışmamızın en önemli amacı; elde edilen PFGE bulgularına dayanarak bir VRE salgının varlığını, salgın suşları arasındaki klonal ilişkiyi göstererek ortaya koymaktır. Bu sebeple hastanın klinik öyküsü ve örneklerin toplanma bölgeleri dikkate alınarak tanımlanan 3 grup içerisinde yer alan klinik materyalden izole edilen VRE izolatlarının grup içerisindeki klonal ilişkileri kadar, gruplar arası klonal ilişkinin veya ilişkisizliğin gösterilmesi de, PFGE yönteminin, salgın tanımlamasındaki duyarlılık ve ayırım gücünü tespit etmeye anlamlı olacaktır. Biz bu sebeple 3 grupta yer alan toplam 79 VRE/VSE izolatının PFGE kalıplarını genel bir dendrogram üzerinde karşılaştırdık. Bu kıyaslamada değerlendirdiğimiz 79 enterokok izolatının en az %80 benzerlik gösteren 28 klonal küme içerisinde yer aldığını gördük. En büyük küme suşların 35 (%44,3)'ünü içine alan "D" kümesi idi (D₁₋₃₀). Bu "D" kümesinin içerisinde yer alan izolatların 20 (%57,1)'si hastane enfeksiyonu ve 12 (%34,3)'si kolonizasyona yol açan VRE izolatı iken 3 (%8,6)'ü toplum kökenli VSE izolatı idi (Şekil 21, Şekil 21-devamı). Bu klonal dağılım grup içi dağılım sonuçları ile kıyaslandığında çok daha ilginç sonuçlara ulaşıldı. Geneldeki klonal küme dağılımında "D" kümesi içerisinde yer alan hastane enfeksiyonu ile ilişkili 20 izolatın tamamının, hastane enfeksiyonu izolatlarının değerlendirildiği klonal kümelenmede aynı "C" küme içerisinde (Şekil 9-10) yer aldıkları görüldü. Yine "D" genel küme yapılanması içerisinde yer alan kolonizasyonla ilişkili 12 izolatın da, kolonizasyon kümelenmesi içerisinde aynı "I" kümesi (Şekil 13-14) içerisinde yer aldıklarını gördük. Hastane enfeksiyonu ile ilişkili "C" kümesi içerisinde yer alan ve genel kümelenmede benzerlik oranları %76,6 olduğu için "D" kümesi dışında kalan 7 izolattan 4'ünün genel kümelenmede "F" kümesini, 2'sinin "G" kümesini ve birisinin de bir kolonizasyon izolatı "VRE-K95" ile birlikte iki üyesi olan "H" kümesini oluşturduklarını gördük. Bu 7 suşun genel dendrogramda farklı kümeler oluşturmaları, dendrogramın değerlendirilen örnek sayısındaki artışa paralel olarak duyarlılığının yani ayırım gücünün arttığını ortaya koymuştur. Bu bulguda "farkı farklılıkta" arayan genotipleme yönteminin duyarlılığını tespit için son derece olumlu bir sonuçtur.

Yüksek ayırım gücüne sahip epidemiyolojik sürveyans yöntemlerin yaratılması arayışlarının başladığı dönemde restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı ve/veya nükleik asit amplifikasyonunu baz alan çok sayıda yöntem denenmiştir. Bunlar arasında nispeten daha basit, ucuz ve hızlı, ancak tekrarlanabilirliği düşük bir yöntem olan RAPD farklı bakterilerde birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır. VRE sürveyansında da bu yöntem alternatif bir yöntem olarak denenmiş ve sonuçları tartışılmıştır. Mesela Noe ile Barbier ve arkadaşları, (1996) Fransa da bir kanser hastanesinde 40 aylık peryotta izole ettikleri 60 *VR. E.faecium* izolatını PFGE ve RAPD yöntemleri ile değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar RAPD'ın, daha düşük ayırım gücüne sahip olmakla beraber PFGE gibi hastane kökenli VRE sürveyansında kullanılabileceğini bildirmişlerdir¹³⁹.

Diğer taraftan N.van den Braak ve arkadaşlarının (2000) VRE klinik izolatlarının genotiplendirilmesinde RAPD ve PFGE yöntemlerini karşılaştırdıkları ve 50'si Hollanda ve 50'si İngiltere'de izole edilmiş *E.faecium*, *E.faecalis*, *E.gallinorum*, *E.avium* ve *E.casseliflavus* türlerinden oluşan 100 VRE izolatını değerlendirdikleri çalışmalarında; RAPD ve PFGE sonuçlarının birbirine benzer olduğunu belirterek, her iki yönteminde birbirleri için iyi bir alternatif olduğunu vurgulamışlardır¹⁴⁰.

Ancak Vancanneyt ve arkadaşlarının (2002), Belçika, Almanya, Yunanistan, İrlanda ve Hollanda gibi farklı Avrupa ülkeleri ile birkaç Avrupa dışı ülkede, insan, hayvan ve besin gibi çeşitli kaynaklardan izole edilen vankomisin duyarlı ve dirençli 78 *E.faecium* izolatını RAPD, AFLP ve PFGE tekniği ile inceledikleri çalışmalarında; RAPD-PCR tekniğinin tekrarlanabilirliğinin 0,91, PFGE tekniğinin tekrarlanabilirliğinin de 0,93 olduğunu bildirmişlerdir¹⁴¹.

Ayrıca Werner ve arkadaşları da (2003), 24 enterokok izolatının genetik ilişkilerini tespit amacı ile RAPD, AFLP ve PFGE yöntemlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında; PFGE ile 24 transkonjugatın 22 sini klonal olarak ilişkili, 2'sini de 3 banttan fazla farklılık gösteren muhtemel ilişkili suşlar olarak tanımlamışlardır. RAPD yöntemi ile yaptıkları değerlendirme de 3 farklı primer ile çalışmışlar ve 2. ve 3. primerlerle transkonjugatların tamamının benzer olduğunu, RAPD 1 primeri ile 2 farklı tip elde ettiklerini bildirmişlerdir. AFLP ile bütün transkonjugatları major ilişkili bulan grup, RAPD yönteminin genomdaki minör değişiklikleri gösteremediği, düşük tekrarlanabilirlik ve düşük ayırım gücü olması sebebi ile bu yönteminin PFGE veya

AFLP yönteminin yerini alabilecek bir alternatif yöntem olmadığını bildirmiş ve PFGE'nin genotiplemede halen önerilen metot olduğunu vurgulamışlardır¹⁴².

Biz her üç grupta yer alan ve PFGE yöntemi ile değerlendirdiğimiz 79 izolatomuzu RAPD ile de değerlendirdik. Hastane enfeksiyonu ile ilişkili 33 VRE izolatomuzun, RAPD yöntemi ile incelediğimizde, “a-l” olarak adlandırılan 12 farklı gen kümesi elde ettik (Şekil 11-12). Bu kümeler içerisinde en fazla üyeye sahip olan “a” kümesi içerisinde 8 izolatin yer aldığı, bunu 6 izolattan oluşan “e” kümesinin izlediğini gördük. RAPD ile elde ettiğimiz 12 gen kümesi bu yöntemin, sadece 6 gen kümesi veren PFGE'den daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu göstermiştir. Ancak her iki yöntemle oluşan kümelerdeki üyelerin klonal ilişki yönünden dağılımlarının benzerlik göstermediğini ayrıca fenotipik yöntemlerle *E.avium* olarak tanımlanan ve PFGE tiplendirmesinde tek üyeli özel “E” kümesini oluşturan VRE-İ-31 izolatinın RAPD yöntemi ile yapılan gen kümelendirmesinde PFGE ile “C5” olarak tanımlanan VRE-İ-65 *E.faecium* izolatu ile % 100 benzer bulunduğu görülmüştür. Diğer taraftan aynı primerler ve test şartlarını uygulayarak RAPD'ı tekrarladığımızda farklı band sayısı ve dendrogram elde ettik. Bu sonuç RAPD'ın ayırım gücünün yüksekliğine karşılık spesifitesinin ve duyarlılığının düşük olduğunu göstermiştir.

Kolonizasyona sebep olan 30 VRE izolatinın RAPD ile tiplendirilmesi sonucu 14 farklı kümede (a-n) yer aldığı ve en büyük kümenin 4 üyeli “a” kümesi olduğu ve ardından 3'er üyeli b, h, l, j ve 2'şer üyeli d, e, f, g, ı kümelerinin geldiği ve 1 üyeli 4 kümenin yer aldığını tespit ettik.(Şekil 15-16). RAPD ile elde edilen profillerin PFGE ile karşılaştırılması sonucu; RAPD ile %100 benzerlik gösteren izolatların PFGE ile farklı kümelerde yer aldığı ve aynı şekilde PFGE ile %100 band benzerliği olan izolatların RAPD yöntemi ile değişik kümelerde bulunduğu ve bu grupta da iki yöntemin birbiri ile uyum göstermediği tespit edilmiştir.

Diğer taraftan RAPD ile incelenen 16 VSE suşunun “a-k” olarak adlandırılan 11 RAPD kümesi oluşturdıkları gözlenmiştir. 3'er üyeli “a “ ve “h” kümeleri ve 2 üyeli “e” kümesi ve 1'er üyeli 8 küme elde edildi (Şekil 19-20) “a” kümesinde yer alan 3 izolatin PFGE'ile de tek küme içerisinde yer aldığı ancak “h” kümesi içerisinde yer alan 3 izolatin PFGE ile yapılan tiplendirmede 3 farklı gen kümesi içerisinde yer aldıkları görülmüştür. Sonuç olarak her üç grupta da PFGE ve RAPD sonuçlarına dayalı oluşturulan kümelerin sayı ve üye dağılımlarının benzer olmadıkları, aynı örneklerin

tekrarlanan RAPD sonuçlarının birbiri ile uyumsuz olduğu, yani RAPD'ın tekrarlanabilirlik değeri düşük olduğu, ancak PFGE yönteminin long-term ve short-term salgın sürveyansında güvenilir, yüksek ayırım gücüne sahip, standardize edilebilir bir moleküler epidemiyolojik yöntem olduğu kanaatine varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hastane enfeksiyonlarına yol açan VRE suşlarının epidemiyolojik sürveyansında kullanılan PFGE ve RAPD testlerinin uygulanabilirliklerinin, 33'ü hastane enfeksiyonu ile uyumlu hastalara ait klinik materyallerden, 30'u hastanede yoğun bakım servislerinde takip edilen ancak enfeksiyon bulgu ve yakınması olmayan hastaların perirektal sürüntü örneklerinden, kolonizasyona işaret olmak üzere izole edilen ve 16'sı da çeşitli poliklinik ve kliniklerde takip edilen ancak hastane enfeksiyonuna uymayan öyküye sahip olan hastaların klinik örneklerinden izole edilmiş olan 79 enterokok izolatu kullanılarak, test edildiği bu çalışma sonunda;

- 1- Toplumda VSE yaygın iken, hastanemizde VRE hakimiyetinin olduğu,
- 2- Özellikle glikopeptit grubu antibiyotikler başta olmak üzere beta-laktam ve aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı kolay direnç geliştiren ve direnç ile ilgili mobil elementleri paylaşabilen *E.faecium* suşlarının gerek hastane kökenli enfeksiyonlardan sorumlu izolatlar (%93,4), gerekse hastanedeki kolonizasyonu yaratan enterokok izolatları arasında (%100) baskın tür olduğu, ancak bu türün toplumda da %50 gibi yüksek oranlara ulaştığı için izlenmesi gerektiği,
- 3- Hastane enfeksiyonu ile ilişkili izolatlar ile hastanede kolonizasyon yaratan izolatlardan, *E.faecium* olarak tanımlanan izolatların tamamı ile *E.gallinorum* ve *E.avium* izolatlarımızın vankomisine karşı dirençli olup bu suşlar arasında teikoplanin direncinin (%93,5-%80) gibi yüksek oranlara ulaşarak dünya ortalamalarını yakaladığı ve ABD verilerini geçtiği, ancak toplum kökenli izolatlarımızda glikopeptit grubu antibiyotiklerin hiç birisine henüz direnç gelişmemiş olduğu,
- 4- Zaman zaman yatan hastanın endojen florasından kaynaklanan enfeksiyonlar ve küçük salgınlar ile kolonizasyonlar görülmesine rağmen, hastane kökenli VRE enfeksiyonlarının, hastaneye egemen bir salgın suşundan kaynaklandığı, ancak bu suşun uzun süreden beri hastanede persiste etmesi sebebi ile genomunda bazı mutasyonların

meydana geldiği, kolonizasyonla ilgili suşların da PFGE yöntemi ile, genel olarak hem kendi içlerinde büyük klonal kümeler oluşturdıkları hemde enfeksiyon suşları ile ilişkili bir büyük klonal küme oluşturdıkları, bu sebeplede PFGE yönteminin yüksek ayırım gücüne sahip bir yöntem olarak salgın sürveyansında kullanılabileceği,

5- RAPD yönteminin düşük tekrarlanabilirlik ve duyarlılığa sahip sonuçlar ürettiği için PFGE yönteminin bir alternatifi olamayacağı kanaatine varılmıştır. Bu sonuçlara dayanarak aşağıdaki öneriler çıkarılmıştır.

a-Hastane kökenli VRE enfeksiyonları için, sağlık çalışanları, hasta ve hasta yakınlarını hedef alan hastane şartlarına göre düzenlenmiş yeni önleyici rehberler oluşturulmalı ve eğitim çalışmalarına hız verilmelidir.

b-Başta VRE olmak üzere tüm hastane enfeksiyonu etkenlerine yönelik olarak aktif sürveyans yapılmalı ve bu sürveyans da mikrobiyoloji laboratuvarları daha etkin kullanılmalıdır.

c-VRE izolatlarında glikopeptit grubu antibiyotik türevlerinin tümüne karşı direnç sorgulanmalı ve antibiyotik kullanımı kontrol edilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. **Spelman DW.** Hospital-acquired infections. *MJA Practice Essentials*. **2002**;176:286-291.
2. **Danielle MZ, Garrison MM, Allpress AL, Heath J, Christakis DA.** Infection Control Policies and Hospital-Associated Infections Among Surgical Patients: Variability and Associations in a Multicenter Pediatric Setting. *Pediatrics*. **2005**; 115: 387-397.
3. **Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ.** Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**; 19: 512-530.
4. **Lewis CM , Zervos MJ.** Clinical manifestations of enterococcal infection. *European Journal of Clinical Microbiology-Infectious Diseases*. **1990**; 9: 111-117.
5. **Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG.** Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. **2000**; 13: 686-707.
6. **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.
7. **Stampone L, Del Grosso M, Boccia D, Pantosti A.** Clonal spread of a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Strain among Bloodstream-Infecting Isolates in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. **2005**; 43: 1575-1580.
8. **Abele-Horn M, Vogel U, Klare I, Konstabel C, Trabold R, Kurihara R, Witte W, Kreth W, Schlegel PG, Claus H.** Molecular Epidemiology of Hospital-Acquired Vancomycin-Resistant Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. **2006**; 44: 4009-4013.
9. **Huckabee CM, Huskins WC, Murray PR.** Predicting Clearance of Colonization with Vancomycin-Resistant Enterococci and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Use of Weekly Surveillance Cultures. *Journal Of Clinical Microbiology*. **2009**;47:1229-1230.
10. **Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Björkroth KJ, Franz CMAP, Foulquié MMR, Revets H, De Vuyst L, Swings J, Kersters K, Dellaglio F, Holzapfel WH.** Intraspecies GenoMIC Groups in *Enterococcus faecium* and Their Correlation with Origin and Pathogenicity. *Applied and Enviromental Microbiology*. **2002**; 68: 1381-1391.

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

12. **Saeed B, Hallgren A, Jonasson J, Nilsson LE, Hanberger H, Isaksson B.** Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. *APMIS* **2002**;110: 869–74.

13. **Facklam RR, Teixeria LM.** Enterococcus. In: Collier L, Bolows A, Sussman (eds). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial infections*. Vol 2 (Systematic Bacteriology). Ed: Edvard Arnold, 9th edition. London **1998**; 669-682.

14. **MacCallum W, Hastings T.** A case of Acute Endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (Nov. Spec.), with a description of the Microorganism. *J Exp Med*. **1899**; 4: 521–534.

15. **Andrews F, Horder T.** A study of *Streptococci* pathogenic for man. *Lancet*. **1906**; 2:708-713.

16. **Kandler O, Schleifer KH, Dandl R.** Differentiation of *Streptococcus fecalis* Andrewes and Horder and *Streptococcus faecium* Orla-Jensen based on the Amino acid composition of their murein. *Journal of Bacteriology*. **1968**; 96:1935-1939.

17. **Graham NC, Bartley EO.** Some observations on the classification of *Enterococci*. *Journal of Hygiene*. **1939**; 39:538-552.

18. **Bilström H.** Molecular epidemiology of clinical *E.faecium*. Carolinska Institutet. Thesis **2008**.

19. **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.

20. **Charles MAP, Franz AB, Silberhorn M, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel HW.** Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among *Enterococci* Isolated from Food. *Applied and Environmental Microbiology*. **2001**; 67:4385-4389.

21. **Winn W, Stephan A, Janda W, Koneman EW, Procop G.** *Koneman's Color Atlas and Textbook of diagnostic Microbiology*. Baltimore Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 6. baski. **2006**; 40- 643.

22. **Frankenberg L, Brugna M, Hederstedt L.** *Enterococcus faecalis* Heme-Dependent Catalase. *J Bacteriol*. **2002**; 184: 6351–6356.

23. **Murray BE, Singh KV, Ross RP, Don Heath J, Dunne GM, Weinstock MG.** Generation of Restriction Map of *Enterococcus Faecalis* OG1 and Investigation of Growth requirements of Growth requirements and regions encoding biosynthetic function. *Journal of Bacteriology*. **1993**; 175:5216-5223.

24. Svec P, Devriese LA, Sedlacek I, Baele M, Vancanneyt M, Haesebrouck F, Swings J, Doskar J. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2001**; 51:1567-1574.

25. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. **2009**;155:1749-1757.

26. Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umapathy BL. Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*.**2009**; 27:301-305.

27. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*. **2003**; 60:2622–2636.

28. Shankar N, Baghdayan AS, Willems R., Hammerum AM, Jensen LB. Presence of Pathogenicity Island Genes in *Enterococcus faecalis* Isolates from Pigs in Denmark. *Journal of Clinical Microbiology*.**2006**; 44:4200-4203.

29. Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS.. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*. **2002**; 417: 746-750.

30. Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, Embden JV, Willems RJL. A Novel Putative Enterococcal Pathogenicity Island Linked to the *esp* Virulence Gene of *Enterococcus faecium* and Associated with Epidemicity. *Journal of Bacteriology*. **2004**; 186: 672-682.

31. Versteeg L. Pathogenesis of *Enterococcus faecalis* Infections Review of the Literature. Chapter I. 1997.

32. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship To Endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. **2004**; 15:308-320.

33. Shankar N, Coburn P, Pillar C, Haas W, Gilmore M. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *International Journal of Medical Microbiology*. **2004**; 293:609-618.

34. Devriese L, Baele M, Butaye P. The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. *Prokaryotes*. **2006**;4:163-174.

35. Cox CR, Coburn PS, Gilmore MS. Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr Protein Pept Sci*. **2005**; 6:77-84.

36. Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing. *Nature*. **2002**; 415:84-87.
37. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2004**;54:232-235.
38. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal Surface Protein, Esp, Enhances Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*. **2004**; 72:6032-6039.
39. Coque TM, Willems RJL, Fortuín J, Top J, Diz S, Loza E, Canto'n R, Baquero F. Population Structure of *Enterococcus faecium* Causing Bacteremia in a Spanish University Hospital: Setting the Scene for a Future Increase in Vancomycin Resistance. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. **2005**; 49:2693-2700.
40. Marques EB, Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *J. Med Microbiol*. **2004**; 53:1069-1073.
41. Sillanpaa J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE. Distribution of Genes Encoding MSCRAMMs and Pili in Clinical and Natural Populations of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. **2009**;47:896-901.
42. Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, Huebner J. Alanine Esters of Enterococcal Lipoteichoic Acid Play a Role in Biofilm Formation and Resistance to Antimicrobial Peptides. *Infection and Immunity*. **2006**; 74:4164-4171.
43. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*. **2003**; 88: 269–290.
44. Murray BE. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. *Emerging Infectious Diseases*. **1998**; 4:37-47.
45. Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Schaffner W, Moore M, Whitney CG, Jorgensen JH, Klugman KP. Novel Mechanism of Resistance to Oxazolidinones, Macrolides, and Chloramphenicol in Ribosomal Protein L4 of the Pneumococcus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2005**;4:3554-3557.
46. Gómez-Gila R, Romero-Gómez MP, García-Arias A, Ubedab MG, Busseloc MS, Cisternac R, Gutiérrez-Altés A, Mingorancea J. Nosocomial outbreak of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **2009**; 65:175–179.
47. Reynolds PE, Courvalin P. Vancomycin Resistance in Enterococci Due to Synthesis of Precursors Terminating in D-Alanyl-D-Serine. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. **2005**; 49:21–25.

48. **French GL.** Enterococci and Vancomycin Resistance. *Clinical Infectious Diseases* **1998**;27: 75–83.
49. **Marothi YA, Agrihotri H, Dubey D.** Enterococcal resistance –An overview. *Indian Journal of Medical Microbiology.* **2005**; 23:214-219.
50. **Dutka-Malen S, Blaimont B, Wauters G, Courvalin P.** Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1994** ; 38: 1675–1677.
51. **Tambyah PA, Marx JA, Maki DG.** Nosocomial Infection with Vancomycin- dependent Enterococci. *Emerging Infectious Diseases.* **2004**; 10: 1277-1281.
52. **Kirkpatrick BD, Harrington SM, Smith D, Marcellus D, Miller C, Dick J, Karanfil L, Perl TM.** An outbreak of vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* in a bone marrow transplant unit. *Clinical Infectious Diseases.* **1999**; 29:1268-1273.
53. **Zirakzadeh A, Patel R.** Vancomycin-Resistant Enterococci:Colonization, Infection, Detection, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* **2006**; 81:529-536.
54. **Taşbakan M I.** Vankomisine Dirençli Enterokok Olguları *Ankem Derg.* **2010**;24:82-84.
55. **Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC.** Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*; **1988**;1: 57-58.
56. **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.
57. **Aktaş G, Derbentli Ş.** Vankomisine dirençli Enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal Of Infection)* **2009**; 23 (4): 201-209,
58. **Guidelines For The Prevention And Control Of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) In Long Term Care Facilities; Maryland Department of Health and Mental Hygiene Epidemiology and Disease Control Program. March 1996.**
59. **Bakir 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.
60. **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.

61. Vural T, Şekercioğlu AS, Ögünç D. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. ANKEM Derg 1999; 13: 1-4.
62. Yıldırım M. Enterokoklar ve Enterokoklarla Gelisen Enfeksiyonlar. *Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2007; 2: 46-52.
63. Kinnebrew MA, Ubada C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against Vancomycin-resistant *Enterococcus* infections. *J.Infect. Dis*. 2010; 201:534-543.
64. Brandl K, Plitas G, Mihu CN, Ubada C, Jia T, Fleisher M, Schnabl B, Dematteo RP, Pamer EG. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*. 2008;455:804-808.
65. Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *MJA*. 2007; 186: 454-457.
66. Sood S, Malhotra M, Das-Arti Kapil BK. Enterococcal infections - antimicrobial resistance. *Indian J Med Res*. 2008;128:111-112.
67. Butler KM. Enterococcal infection in children. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2006;17:128-139.
68. Taşova Y, İnal AS. Enterokok enfeksiyonlarında klinik. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar. *BilimselTıp Yayınevi*. 2004; 17-22.
69. Zeana C, Kubin JC, Della-Latta P, Hammer SM. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* meningitis successfully managed with linezolid: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 33:477-482.
70. 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.
71. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2007; 13: 1–46.
72. Bejuk D, Begovac J, Gamsberger D, Kucisec-Tepes N. Evaluation of phenotypic characteristics for differentiation of enterococcal species using an example based algorithm. *Diagn.Microbiol. Infect. Dis*. 2000; 38: 201– 205.
73. Day AM, Sandoe JAT, Cove JH, Phillips-Jones MK. Evaluation of a biochemical test scheme for identifying clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Lett. Appl. Microbiol*. 2001; 33:392–396.

74. **Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kerster K, Swings J, Dellaglio F.** Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* **2001**; 68:303–316.
75. **Devriese LA, Vancanneyt M, Descheemaeker P, Baele M, Van Landuyt HW, Gordts B, Butaye P, Swings J, Haesebrouck F.** Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *J. Appl. Microbiol.* **2002**; 92:821–827.
76. **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**; 125:165–172.
77. **Tomayko JF, Murray BE.** Analysis of *Enterococcus faecalis* Isolates from Intercontinental Sources by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* **1995**;33:2903-2907
78. **Feizabadi MM, Aliahmadi A, Mobasheri F, Asgharzadeh A, Asadi S, Etemadi G.** Phenotypic characteristics and population genetics of *Enterococcus faecalis* cultured from patients in Tehran during 2000–2001. *Can. J. Microbiol.* **2003**;49: 645–649.
79. **Hsieh SE.** Antimicrobial susceptibility and species identification for clinical isolates of enterococci. *J. Microbiol. Immunol Infect.* **2000**;33:253-257.
80. **Hufnagel M, Carey VJ, Baldassarri L, Reinert RR, Huebner J.** Distribution of four capsular serotypes of *Enterococcus faecalis* among clinical isolates from different geographical origins and infection sites. *Infection.* **2006**;34:22-25.
81. **Fabretti F, Huebner J.** Implant infections due to enterococci: role of capsular polysaccharides and biofilm. *Int J Artif Organs.* **2005**; 28:1079-1090.
82. **Sharpe ME , Shattock F.** The Serological Typing of Group D Streptococci associated with Outbreaks of Neonatal Diarrhoea. *J. gen. Microbio.* **1952**; 6: 150-165.
83. **Savor C, Pfaller MA, Kruszynski JA, Hollis RJ, Noskin GA, Peterson LR.** Comparison of genomic methods for differentiating strains of *Enterococcus faecium*: assessment using clinical epidemiological data. *J. Clin. Microbiol.* **1998**; 36: 3327–3331.
84. **Mannu L, Paba A, Pes M, Floris R, Scintu MF, Morelli L.** Strain typing among enterococci isolated from homemade Pecorino Sardo cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**;170:25–30.
85. **Son R, Nimita F, Rusul G, Nasreldin E, Samuel L, Nishibuchi M.** Isolation and molecular characterisation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Malaysia. *Lett. Appl. Microbiol.* **1999**; 29:118–122.
86. **Brisse S, Fussing V, Ridwan B, Verhoef J, Willems RJL.** Automated ribotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2002**; 40: 1977–1984.

87. **Hammerum AM, Fussing V, Aarestrup FM, Wegener HC.** Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by RiboPrinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**;45: 677– 680.

88. **Price CS, Huynh H, Paule S, Hollis RJ, Noskin GA, Pfaller MA, Peterson LR.** Comparison of an automated ribotyping system to restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis for differentiating vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2002**;40: 1858– 1861.

89. **Knijff E, Dellaglio F, Lombardi A, Andrighetto C, Torriani S.** Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *dll* genes. *J. Microbiol. Methods.* **2001**;47: 35–40.

90. **Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P.** Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **1995**;33: 24– 27.

91. **Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Claverie-Martin FA.** PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2002**; 42: 273– 277.

92. **Eaton TJ, Gasson MJ.** Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic Exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**;67:1628–1635.

93. **Chiew YF, Hall LMC.** Comparison of three methods for the molecular typing of Singapore isolates of enterococci with high-level aminoglycoside resistances. *J. Hosp. Infect.* **1998**;38:223–230.

94. **Van den Braak N, Van Belkum A, Van Keulen M, Vliegenthart J, Verbrugh HA, Endtz HP.** Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalised patients and poultry products in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **1998**;36:1927– 1932.

95. **Devriese LA, Vancanneyt M, Descheemaeker P, Baele M, Van Landuyt HW, Gordts B, Butaye P, Swings J, Haesebrouck F.** Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *J. Appl. Microbiol.* **2002**; 92:821– 827.

96. **Jureen R, Top J, Mohn SC, Harthug S, Langeland N, Willems RJL.** Molecular Characterization of Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Hospitalized Patients in Norway. *Journal Of Clinical Microbiology.* **2003**;41:2330-2336.

97. **D'Agata EMC, Gerrits MM, Tang YW, Samore M, Kusters JG.** Comparison of pulsed field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism for epidemiological investigations of common nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol.* **2001**;22:550-554.

98. **Bedendo J, Pignatari AC.** Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2000**; 33: 1269– 1274.

99. Sechi LA, Zuccon FM, Mortensen JE, Daneo-Moore L. Ribosomal RNA gene (rrn) organization enterococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**;120: 307– 314.
100. Park Y-J, Oh EJ, Kim BK, Kim SM, Shim SI. Phenotypic characteristics of *Enterococcus faecium* variants confirmed by intergenic ribosomal polymerase chain reaction and *E. faecium* polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **1999**;34:269– 273.
101. Poyart C, Quesnes G, Trieu-Cuot P. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **2000**; 38:415–418.
102. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, Van Embden JDA, Willems RJJ. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **2002**;40:1963–1971.
103. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *Am. J. Med.* **1997**;101:284–293.
104. Joseph WC. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clinical Infectious Disease*. **2000**;31:586–589.
105. Moellering RC, Wennersten Jr, and C. Therapeutic potential of rifampin in enterococcal infections. *Rev. Infect. Dis.* **1983**;5:528–532.
106. Testa RT, Peterson PF, Jacobus NV, Sum P, Lee VJ, Tally F. In vitro and in vivo antibacterial activities of the glycylcyclines, a new class of semisynthetic tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**;37:2770–2777.
107. Burney S, Landman D, Quale JM. Activity of clinafloxacin against multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother* **1994**; 38:68–70.
108. Piddock LJV. New quinolones and gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**; 38:163–169.
109. Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, Sahm DF. In vivo development of teicoplanin resistance in VanB *Enterococcus faecium* isolate. *J. Infect. Dis.* **1993**; 167:1224–1227.
110. Sabol K, Patterson JE, Lewis JS. Emergence of Daptomycin Resistance in *Enterococcus faecium* during Daptomycin Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **2005**; 49:1664–1665.
111. Schwalbe RS, McIntosh AC, Qaiyumi S, Johnson JA, Johnson RJ, Farness KM, Holloway WJ, Steele-Moore L. In vitro activity of LY333328, an investigational glycopeptide antibiotic, against enterococci and staphylococci. *Antmicrob. Agents. Chemother.* **1996**; 40:2416–2419.

112. **Bostic G D, Peri LA, Thal LA, Zervos MJ.** Comparative in vitro and bactericidal activity of oxazolidinone antibiotics against multidrug-resistant enterococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **1998**; 30:109–112.
113. **Alp Ş, Şardan YÇ.** Vankomisine dirençli enterokokların epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hacettepe Tıp Dergisi.* **2008**; 39:89-95.
114. **Centers for Disease Control and Prevention's Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) special report.** Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* **1995**; 16:105-113.
115. **Tacconelli E, Cataldo MA.** Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *Int J. AntiMicrob. Agent.* **2008**; 31:99-106.
116. **Kim M, Lee S, Lim J, Seo KS, Kim Y, Han K, Choi JH, Yoo JH, Choi SM, Shin WS, Lee DG, Kim KM.** Rectal Surveillance Culture of Vancomycin-Resistant Enterococci in Hospitalized Patients at Hematology-Oncology Unit. *Infect Chemother.* **2003**; 35:123-129.
117. **Garcia-Migura L, Pleydell E, Barnes S, Davies RH, Liebana E.** Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Broiler Poultry and Pig Farms in England and Wales. *Journal of Clinical Microbiology.* **2005**; 43:3283–3289.
118. **Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG Jr, Sulakvelidze A.** Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* **2000**; 38:4242-4254.
119. **Wang Y, Kumar VS, Kari N, Gadwala M.** Optimization of the conditions for RAPD analysis of Enterococci isolated from Silkworm *Bombyx mori* . *Current Biotica.* **2009**; 3:127-134.
120. **Martone WJ.** Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **1998**; 19: 539– 545.
121. **Werner G, Coque TM, HammerumAM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq 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**;13:47.
122. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States, 1989-1993. *MMWR-Morb Mortal Wkly Rep* **1993**; 42: 597-9.
123. **Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA.** Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis* **2001**; 1: 314-25.
124. **Wegener HC.** Historical yearly usage of glycopeptides for animals and humans: the American-European paradox revisited. *Antimicrob Agents Chemother.* **1998**;42:3049.

125. **Rudy M, Zientara M, Bek T.** Occurrence of antibiotic resistant enterococci in clinical specimens from a pediatric hospital. *Pol J Microbiol* . **2005**; 54: 77-80.

126. **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.

127. **D'azevedo PA, Furtado GHC.** Molecular characterization of Vancomycin Resistant Enterococci strains eight years apart from its first isolation in Sao Paulo, Brazil. *Rev. Inst .Med.trop.S.Paulo*.**2008**;50: 195-198.

128. **Aygün H, Memikoğlu OK, Tekeli A, Azap A, Yörük F.**Hastanede Yatan Riskli Hasta Gruplarında Vankomisine Dirençli Enterokok Kolonizasyonunun Sürveyansı. *Türk Anest Rean Der.* **2008**; 36:168-173.

129. **Nichol KA, Sill M , Laing NM,. Johnson JL, the NAVRESS Group, Hobana DJ, Zhanel GG .** Molecular epidemiology of urinary tract isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from North America. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **2006**;27:392–396.

130. **Corso AC, Gagetti PS, Rodri'guez MM, Melano RG, Ceriana PG, Faccone DF, Galas MF.** Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *International Journal of Infectious Diseases*. **2007**;11: 69-75.

131. **Cheng VCC, Chan JFW, Tai JWM, Ho YY, Li IWS, To KKW, Ho PL.** Successful control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak in a neurosurgical unit at non-endemic region. *Emerging Health Threats Journal*. **2009**; 2: 9.

132. **Brilliantova AN, Kliasovaa GA, Mironovaa AV, Tishkovb VI, Novichkovac GA, Bobryninac VO, Sidorenkod SV.** Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in two haematological centres in Russia. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2010**; 35: 177–181.

133. **Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecon MA, Ortega M, Coque TM, Garcia M, Saez-Nieto JA.** Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.**2009**; 63:17–20.

134. **Abele-Horn M, Vogel U, Klare I, Konstabel C, Trabold R, Kuihara R, Witte W, Kreth W, Schlegel PG, Claus H.** Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant Enterococci. *J Clin Microbiol*. **2006**;43:4009-4013.

135. **Zhu X, Zheng B, Wang S, Willems RJL, Xue F, Cao X, Li Y, Bo S, Liu J.** Molecular characterisation of outbreak-related strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from an intensive care unit in Beijing,China. *Journal of Hospital Infection* . **2009**; 72:147-154.

136. Stampone L, Del Grosso M, Boccia D, Pantosti A. Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. *J Clin Microbiol* **2005**;43:1575-1580.
137. Haillgren A, Claesson C, Saeedi B, Monstein HJ, Hanberger H, Nilsson LE. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolyisin genes and invitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *International Journal of Medical Microbiology* . **2009**; 299:323–332.
138. Zarrilli R, Tripodi MF, Popolo AD, Fortunato R, Bagattini M, Crispino M, Florio A, Triassi M, Utili R. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2005**; 56:827-835.
139. Barbier N, Saulnier P, Chachaty E, Dumontier A, Andremont A. Random Amplified Polymorphic DNA Typing versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Epidemiological Typing of Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*. **1996**;34:1096–1099.
140. Van den Braak N, Power E, Anthony R, Endtz HP, Verbrugh HA, Van Belkum A. Random Amplification of Polymorphic DNA versus Pulsed Field Gel Electrophoresis of SmaI DNA Macrorestriction Fragments for Typing Strains Of Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *FEMS Microbiology Letters*. **2000**;192:45-52.
141. Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Björkroth KJ, Franz CMAP, Moreno MRF, Revets H, De Vuyst L, Swings J, Kersters K, Dellaglio F, Holzapfel WH. Intraspecies genoMic groups in *E. faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*. **2002**;68:1381-1391.
142. Werner G, Rob J, Willems L, Hildebrandt B, Klare I, Wolfgang W. Influence of Transferable Genetic Determinants on the Outcome of Typing Methods Commonly Used for *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. **2003**;41: 1499–1506.
143. 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.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Beril AKÇİMEN
Doğum Tarih ve Yeri : 07.01.1965, Adana
Medeni Durumu : Evli
Adres : Güzelyalı mahallesi 81003 Sokak Güzelyalı
Apartmanı Kat3 No3 ADANA
Telefon :506 5640224
Faks :-
E.posta :bakcimen@mynet.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi :Çukurova Üniversitesi
Varsa Mezuniyet Derecesi :
Görev Yerleri : Amasya: I no'lu Merkez Sağlık Ocağı
Adana: Nusret Karasu Göğüs Hastalıkları
Hastanesi
Dernek Üyelikleri : KLİMUD
Alınan Burslar :Yok
Yabancı Dil(ler) : İngilizce
Diğer Hususlar :-