

T.C

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**ESKİŞEHİR'DE TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ'NDE VANKOMİSİN DİRENÇLİ
ENTEROKOKLARIN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ANALİZİ**

Dr. Buket YAYLA

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Gül DURMAZ

ESKİŞEHİR

2007

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Buket YAYLA'ya ait "Eskişehir'de Tıp Fakültesi Hastanesi'nde vankomisin dirençli enterokokların moleküler epidemiyolojik analizi" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Anadalında Uzmanlık tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:26/07/2007

Jüri BaŐkanı	Prof. Dr. Yurdanur AKGÜN Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	İmza
Üye	Prof. Dr. Gül Durmaz Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	İmza
Üye	Prof. Dr. Tercan Us Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	İmza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun
Tarih ve Sayılı kararıyla onaylanmıőtır

Prof. Dr.
Dekan

TEŞEKKÜR

Bilimsel titizliği ve çalışma disiplinini örnek aldığım,huzurlu ve seviyeli bir ortamda çalışmamızı sağlayan,bilgi ve tecrübeleri ile bize yön veren anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Yurdanur Akgün'e, uzmanlık eğitimi süresince, geniş bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, eğitimimde büyük katkısı bulunan hocalarım Prof. Dr. Filiz Akşit'e, Prof. Dr. Tercan Us'a, Prof. Dr. Nuri Kiraz'a, Prof. Dr. Gül Durmaz'a, tezimin PFGE aşamasında tecrübelerini benimle paylaşan GATA Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. M. Ali Saraçlı ve Doç. Dr. Abdullah Kılıç'a, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli uzman ve asistan arkadaşlarıma ve asistanlığım süresince dostluk ve yardımlarını esirgemeyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm personeline teşekkür ederim.

ÖZET

Yayla, B. Eskişehir’de Tıp Fakültesi Hastanesi’nde vankomisin dirençli enterokokların moleküler epidemiyolojik analizi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2007. Bu çalışmada bir yıllık bir zaman dilimi içinde ESOGÜ Tıp Fakültesi Hastanesi yoğun bakım ünitesi hastalarında, haftada bir kez alınan sürveyans kültürleriyle VRE gastrointestinal sistem taşıyıcılığının araştırılması ve elde edilen VRE izolatlarının direnç genotiplerinin ve genetik yakınlıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma süresince çeşitli klinik örneklerden patojen olarak soyutlanan VRE suşları da çalışmaya dahil edilmiştir. Suşların identifikasyonu VITEK 2 Compact Sistem GP kartları ile, antibiyotik duyarlılıkları VITEK 2 Compact Sistem AST kartları ve E-test yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Glikopeptid direnç genotipi saptamada multiplex PCR, klonal ilişkinin belirlenmesinde ise PFGE yöntemleri kullanılmıştır. Sürveyans kültürlerinin % 4,8’inde (58/1200), klinik örneklerden izole edilen enterokok izolatlarının % 0,5’inde (3/529) VRE saptandı. Bu suşların tümü *E. faecium* olarak tanımlandı. E-test ile suşların tümünde vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri 256 mg/L üzerinde bulundu. Suşların hiçbirinde quinopristin-dalfopristin ve linezolid direncine rastlanmadı. Moleküler testlerle suşların hepsinin *van A* genotipinde olduğu ve tek bir klondan köken aldıkları saptandı. Aynı dönemde VRE enfeksiyonu/kolonizasyonu saptanan hastaların büyük bölümü (5/7) pediatri YBÜ hastalarıydı. Hastanemizde ilk olarak 2002 yılında kolonizan olarak 2 VRE suşunun tanımlanmasını takiben 2005 yılında alınan sürveyans kültürlerinde % 5,9 (25/420) oranında VRE saptanması ve bizim bulgularımız hastanemizde VRE enfeksiyonlarının karşımıza çıkmaya devam edeceğini düşündürmektedir. Bu nedenle VRE tespiti ve yayılımının önlenmesi konusunda etkin enfeksiyon kontrol uygulamaları bu sorunun gelecekteki boyutunu belirlemede anahtar rol oynayacaktır.

Anahtar Kelimeler:Enterokok, VRE, multiplex PCR, PFGE.

ABSTRACT

Yayla, B. The molecular epidemiologic analysis of vancomycin resistant enterococci in a university hospital in Eskişehir. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Specialty Thesis in Department of Microbiology, Eskişehir, 2007. The aim of this study is to investigate gastrointestinal carriage of VRE at one year period in patients that admitted to intensive care units at Eskişehir Osmangazi University Medical Faculty Hospital by taking surveillance cultures weekly, and to determine the genotypes of vancomycin resistance and clonal relationship in VRE strains. During the study period VRE strains isolated from various clinical specimens were also included in the study. The isolated strains were identified to species level by VITEK 2 Compact System GP cards, and antimicrobial susceptibility testing was determined by VITEK 2 Compact System AST cards and E test method. Determination of glycopeptide resistance genotypes were performed by multiplex PCR and, clonal relations were defined by PFGE method. The ratios of VRE in surveillance cultures and among enterococci isolates of clinical specimens were 4.8% (58/1200) and 0.5% (3/529) respectively. All of the VRE strains were identified as *E.faecium*. MICs of vancomycin and teicoplanin which were tested by E test method were greater than 256 mg/L for all isolates. No strain was found resistant to quinopristin-dalfopristin and linezolid. It was detected all strains which tested by molecular methods had van A genotype and showed relation with one clonal type. At the same period, most of the patients (5/7) who had VRE colonization were in pediatric intensive care unit. After 2 VRE strains were defined as colonizer in our hospital in 2002, detection of VRE ratio as 5,9 % (25/420) in surveillance cultures in 2005 and our results made us consider that VRE infections will go along in our hospital. Therefore, effective infection control applications about VRE detection and preventing, VRE transmission will play a key role in determining the wideness of this problem at the future.

Keywords: Enterococcus, VRE, multiplex PCR, PFGE.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mikrobiyolojik Özellikler.....	3
2.2.Tanı.....	4
2.3.Epidemiyoloji.....	8
2.4.Virulans ve Patojenite.....	9
2.5. Enterokok Enfeksiyonları.....	10
2.6.Antimikrobiyal Duyarlılık ve Direnç.....	13
2.6.1.İntrensek (kromozomal) Direnç.....	14
2.6.2.Ekstrensek (kazanılmış) Direnç.....	15
2.7.Enterokok Enfeksiyonlarında Tedavi.....	24
2.8.VRE ile Kolonizasyon ve Enfeksiyon.....	26
2.8.1.Nozokomiyal VRE Kontrolü.....	29
2.8.2.Sürveyans Kültürleri.....	37
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1.Örneklerin Toplanması.....	38
3.2.Kültürlerin Değerlendirilmesi.....	39
3.3.Bakterilerin İdentifikasyonu.....	40
3.4.Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	40
3.4.1.Otomatize Antibiyotik Duyarlılık Sistemi.....	40
3.4.2.E-test.....	41
3.5.Multiplex PCR Yöntemi ile Direnç Genotipinin Belirlenmesi.....	42
3.6.PFGE ile Klonal İlişkinin Belirlenmesi.....	43
3.6.1.Kimyasal Solüsyonların ve Tamponların Hazırlanması.....	43
3.6.2.PFGE İşlemi.....	45
4.BULGULAR.....	48
5.TARTIŞMA.....	55
6.SONUÇLAR.....	65
KAYNAKLAR.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

AST	Antimicrobial Susceptibility Test
BEA	Safra eskulin azid agar
BHI	Brain-heart infüzyon
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNA	Kolistin nalidiksik asit
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
HICPAC	Hospital Infection Control Practices Advisory Committee
LAP	Lösün-beta-naftilamid
LMA	Low melting agaroz
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyon
MRSA	Metisiline dirençli Staphylococcus aureus
MRSE	Metisiline dirençli Staphylococcus epidermidis
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance
PYR	Pirolidonil- β -naftilamid
PCR	Polimerase chain reaction
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TNF	Tümör nekroz faktör
VDE	Vankomisine bağımlı enterokok
VRE	Vankomisine dirençli enterokok
VRSA	Vankomisine dirençli Staphylococcus aureus
VRSE	Vankomisine dirençli Staphylococcus epidermidis
YDGD	Yüksek düzeyde gentamisin direnci
YDSD	Yüksek düzeyde streptomisin direnci

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Enterokoklardaki glikopeptid direncinin mekanizması.....	20
Şekil 4.1. VRE izolatlarının multiplex PCR ile direnç tipinin gösterilmesi.....	52
Şekil 4.2. VRE suşlarının PFGE ile klonal ilişkilerinin gösterilmesi.....	53
Şekil 4.3. PFGE ile oluşturulan restriksiyon paternlerinin dendogramı.....	54

TABLolar

	Sayfa
Tablo 2.1. Enterokok türlerinin fenotipik özellikleri.....	6
Tablo 2.2. Enterokok türlerinin identifikasyon ağacı.....	7
Tablo 2.3..Enterokoklarda antimikrobiyal direnç.....	13
Tablo 3.1. Enterokoklarda glikopeptid direnc fenotiplerinin özellikleri.....	23
Tablo 4.1. VRE izole edilen hastalara ait demografik veriler.....	49
Tablo 4.2. VRE suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.....	50
Tablo 4.3. VITEK 2 Compact AST paneli ile belirlenen MİK değerleri.....	51
Tablo 4.4. VRE suşları için vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri.....	52

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Patojen bakterilerin antibiyotiklere direnci gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde giderek büyüyen bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Yeni antibakteriyel ilaçların klinik tedaviye girmesi kaçınılmaz olarak bunlara dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ile sonlanmaktadır.

Normal florada bulunan ve ilk tanımlandıkları yıllarda sadece endokardit etkeni olarak bildirilen enterokoklar, son 20 yılda önemli hastane patojenlerinden biri olmuştur. Bu artışın enterokokların intrensek olarak dirençli oldukları üçüncü kuşak sefalosporinlerin yaygın olarak kullanılmaya başlanmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Enterokoklar bugün nozokomiyal üriner sistem ve cerrahi yara enfeksiyonlarında en sık izole edilen ikinci patojen, bakteremide ise en sık görülen üçüncü etkindir. Bazı merkezlerde nozokomiyal enfeksiyonlarda *Escherichia coli*'den sonra en sık izole edilen bakterilerdir. Enterokokların enfeksiyon etkeni olarak sık görülmelerinin yanında çoklu antibiyotik direncine sahip enterokok suşlarının artması da tedavide problem yaratmaktadır.

İlk vankomisine dirençli enterokok (VRE) 1988 yılında saptanmıştır (31). Ülkemizde ise 1997 yılında hasta dışkıları ve kanalizasyon su örnekleri ile yapılan bir çalışmada VRE saptanamamış, ilk VRE suşu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi'nden bildirilmiş, bunu diğer olgular takip etmiştir. Günümüzde, dünyanın hemen her yerinde VRE izole edildiğine dair yayınlar mevcuttur.

Enterokokal enfeksiyonların, genellikle hastanın kendi florasından kaynaklanan endojen enfeksiyonlar olduğu düşünülmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, enterokokların ekzojen yolla da yayılabileceğini göstermiştir. Özellikle dirençli enterokok türleri, hastadan hastaya veya kolonize hastane personeli tarafından hastalara bulaştırılabilmektedir. Ayrıca VRE'nin diğer birçok antibiyotiğe de dirençli olması hastane ortamında kolayca çoğalarak yayılmasına

neden olmaktadır. Bu sebeple VRE izolasyonunu takiben planlanacak sürveyans çalışmaları, enfeksiyon kontrolü açısından çok önemlidir. Hastanede yatan hastalarda dirençli enterokok kolonizasyonunun erken tespiti, enterokok enfeksiyonlarının kontrolünde önemlidir. Dışkı veya rektal sürüntü kültürleri ile kolonizasyonun ortaya çıkarılması, enfeksiyonun yayılımını önlemede önemli bir basamaktır.

Tüm dünyada VRE ile oluşan kolonizasyon ve enfeksiyon oranı artmakta ve bu artışa katkıda bulunan faktörler tanımlanmaktadır. Bugün için kolonizasyonu eradike edecek bir uygulama olmasa da enfeksiyon kontrolü uygulamaları maliyet etkindir ve VRE kolonizasyonunun ve enfeksiyonunun prevalansını azaltmaktadır.

Bu çalışmanın amacı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde kolonizan veya nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak VRE prevalansının saptanması, VRE izolatlarının direnç genotiplerinin ve genetik yakınlıklarının araştırılması aynı zamanda da bu çalışmanın bundan sonraki benzer çalışmalara temel oluşturmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

İlk defa 1899 da Fransa'da yayınlanan bir yazıda intestinal orjinli gram pozitif koklar 'enterocoque' olarak tanımlanmıştır (1). *Streptococcus faecalis* ismi 1906'da endokarditli bir hastanın kanından izole edilen organizmaya verilmiştir. *Streptococcus faecium*' un ilk olarak tanımlanması ise muhtemelen 1919 yılında olmuştur (2). Streptokoklar 1919 yılında Brown tarafından kanlı agarda yaptıkları hemoliz tipine göre alfa, beta , gama hemolitik olarak ilk defa sistematik olarak sınıflandırılmıştır. R. Lancefield, 1933 yılında streptokokları hücre duvarında bulunan polisakkarit C maddesinden yararlanarak presipitasyon testi ile A'dan V' ye kadar gruplandırmıştır. Sherman ise streptokokları; hemoliz, üreme derecesi ve özellikleri, biyokimyasal özellikleri ve antijen yapılarına göre, piyojen, laktik, viridans streptokoklar ve enterokoklar olarak 4 gruba ayırmıştır. *S. faecalis* ve *S. faecium*'un *Streptococcus* genusundan değişik bir genetik yapıya sahip olmaları nedeniyle farklı bir genusa alınmalarını ilk kez 1970 yılında Kalina önermiştir (3). 1980'lerde DNA-DNA ve DNA-ribozomal RNA hibridizasyon çalışmaları bu bakterilerin *Streptococcus* genusunun üyesi olmadığını göstermiştir. 1984'de enterokoklar Schleifer ve Kilpper-Balz tarafından *Enterococcus* genusu içinde yeniden sınıflandırılmışlardır(4).

Bu genus içinde 16 tür yer almaktadır. İnsan hastalıklarından en sık soyutlanan türler *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur. *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinorum*, *E. hirae*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, *E. dispar* ve *E. mundtii* diğer sık raslanan türlerdir. Son birkaç yıl içinde de bazı yeni türler (*E. gilvus*, *E. pallens*, CDC PNS-E1, CDC PNS-E2, CDC PNS-E3) tanımlanmıştır (2,5,6).

2.1.Mikrobiyolojik Özellikler

Enterokoklar tek tek, ikili veya kısa zincir oluşturan katalaz negatif, gram pozitif koklardır. Fakültatif anaerob olup optimal üreme sıcaklığı 35°C'dir. Birçok tür +10 ile +45°C arasında üreyebilir. Koloniler tipik olarak hemolizsizdir. Ancak

α ve β hemoliz yapabilirler. Bütün türler %6.5 NaCl konsantrasyonunda ürer ve %40 safralı besiyerinde eskülini hidrolize ederler. *E. flavescens*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinorum* gibi bazı kökenler hareketlidir. 60°C' de 30 dakika canlılıklarını sürdürebilirler. *E. cecorum*, *E. columbiae* ve *E. saccharolyticus* dışındaki türler pirolidonil- β -naftilamidi (PYR), tüm kökenler lösin- β -naftilamidi (LAP) hidrolize eder. Sitokrom enzimleri yoktur. Glukozdan gaz yapmamaları ile A dışı streptokoklar, *Leuconostoc* ve *Pediococcus*'dan ayrılabilirler (7,8).

2.2.Tanı

Enterokok türleri %5 koyun kanlı kolistin-nalidiksik asit (CNA) ve çukulata agar dahil çoğu bakteriyolojik besiyerinde iyi üreme gösterirler. Koyun kanlı agarda suşların çoğu hemolizsiz veya α -hemolitiklidir. Suşların çoğu 35-37°C' de aerob şartlarda ürer. Ortama CO₂ ilave edilmesi üremeyi stimüle eder. Örnek yoğun olarak gram negatif basille kontamine ise sodyum azid içeren besiyeri (safra-eskülin-azid agar gibi) izolasyonu kolaylaştırır. Ciddi enterokok enfeksiyonu riski taşıyan ve hastanede yatan hastalarda dışkıda enterokok araştırılan epidemiyolojik çalışmalarda sefaleksim-aztreonam-arabinoz agar kullanılabilir. Bu besiyerinde *E. faecium* sarı halolu beyaz koloniler, *E. faecalis* ise halosuz koloniler oluşturmaktadır (5).

Enterokokların tür düzeyinde identifikasyonu tedavi, epidemiyolojik ve enfeksiyon kontrol amaçlı olarak yapılmaktadır. *E. faecium* izolatları penisilin ve ampisiline *E. faecalis* izolatlarından daha dirençlidir. Vankomisin dirençli enterokokların büyük bir kısmı *E. faecium* suşlarıdır. VRE suşlarının çeşitli vücut bölgelerinden (özellikle rektal sürüntülerden) hızlı saptanmasına yönelik agar ve broth besiyerleri kullanılmaktadır. Broth besiyerlerine vankomisin ilavesi (genellikle 6 g/ml) ile besiyeri yarı seçici hale gelmektedir. Ayrıca klindamisin ve aztreonam da ilave edilebilir. Bazı VRE suşları bu kombinasyonlarda inhibe olabilirler. Bu nedenle seçici broth besiyerinden seçici ve seçici olmayan agar besiyerine pasaj yapılması izolasyon şansını arttırabilmektedir.

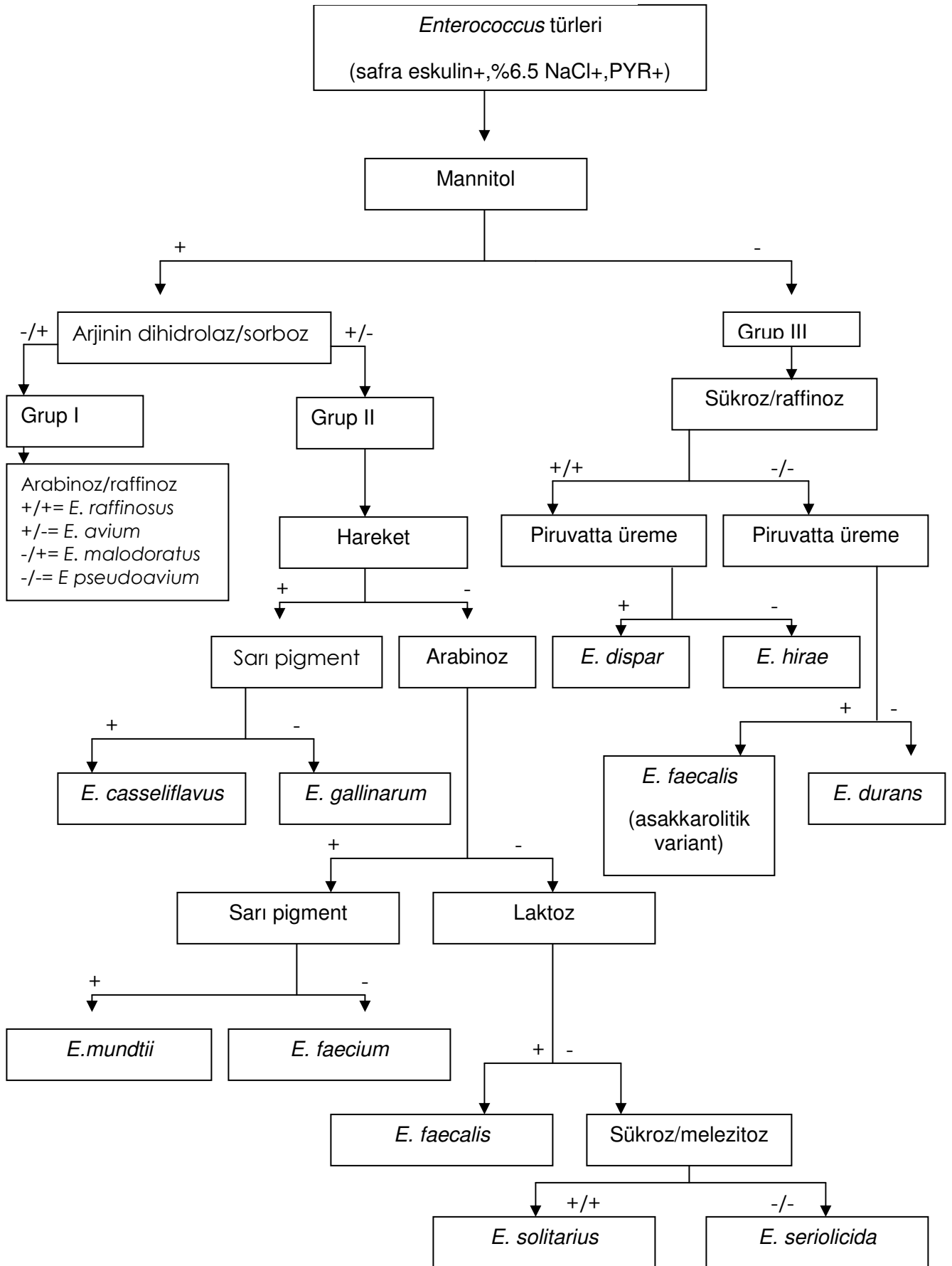
Enterokok türlerinin tanımlanmasında biyokimyasal ve fizyolojik testler kullanılmaktadır. Suşların yaklaşık %80'i kapiller presipitasyon ve lateks aglütinasyon testleri ile Lancefield grup D antiserumu ile reaksiyon verirler. *E. pseudoaerium*, *E. dispar*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, *E. cecorum* ve *E. columbae* suşlarında grup D antijen varlığı saptanmamıştır. *E. cecorum* ve *E. columbae* 10°C'de, *E. Sulfureus*, *E. dispar* ve *E. malodaratus* 45°C'de üreyemezler (5).

Enterokok suşlarının çoğu eskülini %40 safra varlığında hidroliz eder ve %6.5 NaCl varlığında üreyebilirler. PYR pozitifler. Facklam ve Collins enterokokları çeşitli test ortamlarındaki reaksiyonlarına göre 5 grupta toplayarak çeşitli ilave testler ve karakteristik özelliklerine göre de tür ayırımlarını yapmışlardır. Tablo 2.1.'de enterokok türlerinin çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri verilmiştir. Knudtson ve Hartman 1992 yılında klinik olarak önemli enterokok türlerinin tanımlanması için bir akış şeması geliştirmişlerdir (5) (Tablo 2.2).

Tablo2.1. Enterokok türlerinin fenotipik özellikleri

Grup,Tür	Grup D Antijen	Safra- eskulin agarda üreme	%6.5 NaCl'de üreme	10°C'de üreme	45°C'de üreme	Asit Üretimi														
						LAP	PYR	Hareket	Sarı pigment	ADH	HIP	GLU	MNTL	SORB	ARB	SBLT	RAF	SUK	PRV	MGP
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>	+	+	+	+	-	+	+	-	+ ^z	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>Enterococcus sp.</i>	+	+	+	+	+	+ ^z	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Grup III																				
<i>E. dispar</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	D	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. durans</i>	+	+	+		+	+	+	-	-	+	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>E. ratti</i>	+ ^z	+	+	+	+	+	+	-	-	+	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. villorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Grup IV																				
<i>E. asini</i>	+	+	-	D	D	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	D
<i>E. cecorum</i>	-		-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>E. sulfurous</i>	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>E. phoenicolicola</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:arjinin dihidrolaz; HIP:hippurat hidrolizi; GLU:glukoz; MNTL:mannitol; SORB:sorboz; ARB:arabinoz; SBLT:sorbitol; RAF:raffinoz; SUK: sükroz;PRV:pirüvat; MPG:metil- α -D-glukopiranozit;^z:zayıf pozitif; D: değişken



2.3.Epidemiyoloji

Enterokoklar doğada yaygın olarak (toprakta, suda, bitkilerde, hayvanlarda, kuşlarda ve böceklerde) bulunurlar. Esas konakları insan ve hayvanların gastrointestinal sistem florasıdır. Normal aerob barsak florasının önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Dışkıının gramında 10^5 - 10^7 kob' dan daha fazla miktarlarda bulunurlar. İnsan dışkıısından en sık soyutlanan tür *E. faecalis*, ikinci sıklıkta sık görülen tür *E. faecium*'dur. Az miktarlarda enterokok orofarinks, vajinal sekresyonlar ve ciltte özellikle de perineal bölgede bulunabilmektedir (2,6).

Enterokok enfeksiyonlarının %60'ı nozokomiyaldir. Bu enfeksiyonların yarısı yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir. Enterokoklar Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından 1990-1992 yıllarında *E coli* ve stafilokoklardan sonra 3. sık görülen nozokomiyal etken olarak bildirilmiştir. Bütün nozokomiyal enfeksiyonların %10'unda, bakteremilerin %9'unda ve nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının yaklaşık %16'sında etkendirler (9).

İlk VRE 1988 yılında İngiltere'den Uttley ve ark'ları (31) tarafından bildirilmiştir. Bunu diğer Avrupa ülkeleri ve ABD'den bildirilen olgular ve VRE epidemileri izlemiştir. 1989'dan 1993'e NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance)'a bildirilen VRE oranı % 0.3'den % 7.9'a çıkmıştır. Özellikle yoğun bakımlarda bu oran % 0.4'den %13.6'ya çıkarak 34 kat artış göstermiştir (10). İngiltere'de yapılan 1971-1985 yılları arasındaki kan kültür izolatları arasında görülme sıklığı %3 iken, 1986-1995 yılları arasında bu oran %12'ye yükselmiştir. 2000 yılında ise hem yoğun bakım ünitelerinde hem de normal servislerde nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak VRE görülme sıklığı %25'in üzerine çıkmıştır.

Türkiye' de vankomisin dirençli ilk *E. faecium* suşu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi'nden Vural ve ark'ları tarafından bildirilmiştir. Bu suş, malign histiyositozis tanısı almış bronkopulmoner enfeksiyonu olan 11 aylık bir erkek

bebekten, 15 gün arayla alınmış iki ayrı plevra sıvısından izole edilmiştir (11). Bunu diğer merkezler takip etmiştir.

2.4.Virulans ve Patojenite

Enterokokların virulansını açıklayan faktörler henüz tam netlik kazanmamıştır. Klasik virulans faktörlerine sahip olmamalarına rağmen enterokokların çok sayıda antimikrobiyal ajana dirençli olmaları, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan hastalarda ekolojik avantaj kazanıp çoğalmalarına izin vermekte ve süperenfeksiyonlara yol açmaktadır (12).

Sitolizin

Bazı *E. faecalis* suşları insan, tavşan, sığır ve at eritrositlerini etkileyen bir sitolizin/hemolizin üretmektedir. Sitolizini kodlayan gen plazmid üzerinde ya da kromozoma entegre olarak bulunabilmektedir. Tavşan endoftalmit ve endokardit modellerinde belirgin sitotoksitesi olduğu gösterilmiştir. İnsan ile at kanlı agarlarda hemoliz yaparken, koyun kanlı agarda hemoliz yapmaması tanısal açıdan önemli bir özelliktir.

Agregasyon maddesi

Plazmid tarafından kodlanan, bakteri yüzeyine bağlı bir protein olup organizmaların kümeleşmesini ve böylece plazmid aktarımının artmasını sağlamaktadır. Bu yapı bakterinin intestinal ve renal epitel hücre kültürlerine aderansının gerçekleşmesinde ve tavşan endokardit modelinde kardiyak vejetasyonlarda üremeyi tetiklemede rol oynamaktadır. Yapılan diğer çalışmaların sonuçları bu proteinin enterokokların nötrofillere ve intestinal epitel hücrelerine bağlanma, hücre içine girme ve hücre içinde yaşamlarını sürdürme ile de ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Ekstrasellüler yüzey proteini (Esp)

İlk kez *E. faecalis* türlerinde tanımlanmıştır. Büyük kompleks bir yüzey proteindir. Hücre yüzeyinden uzaklaşma yeteneğiyle organizmanın antikorlardan kaçmasına yardım etmektedir

Lipoteikoik asit

Enterokokların D grubu antijenini oluşturur. TNF (Tümör nekroz faktör) ve interferon salınmasına neden olur.

Feromonlar

Bakteri tarafından salınan küçük peptitlerdir. Suşlar arasında plazmidlerin konjugatif transferini kolaylaştırdıkları ve nötrofillere kemoatraktan oldukları sanılmaktadır.

E. faecalis suşlarının %50-60'ı tarafından üretilen ekstrasellüler metalloendopeptidaz olan kokolizin vazoaktif bir peptit olan endotelini inaktive ederek virulansta rol oynayabilir. Ayrıca çeşitli tipte konak hücreye tutunmayı sağlayan karbonhidrat adezinler, jelatin, kollagen, hemogloblin ve diğer küçük peptidleri hidrolize eden jelatinaz gibi virulans faktörleri de tanımlanmıştır (5,13).

2.5. Enterokok Enfeksiyonları

Son yıllarda enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar belirgin şekilde artmış olup, özellikle hastane enfeksiyonlarına neden olan etkenler arasında ilk sıralarda yer almaya başlamıştır. Özellikle hastanede yatan, yaşlı, immün düşkün ve ciddi kronik hastalığı olanlarda hastalık oluşturmaktadır.

Tüm enterokok enfeksiyonlarının % 80-90'ından *E. faecalis*, %5-15'inden ise *E. faecium* sorumludur. *E.gallinorum*, *E.casseliflavus*, *E. avium* ve *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türleri klinik örneklerin %5'inden izole edilmiştir (14).

2.5.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları

Enterokokların etken olduğu enfeksiyonlardan en sık görülenidir. ABD' de enterokoklar nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonları arasında ikinci en sık etkindir. Çoğu üriner enfeksiyon nozokomiyaldir veya üriner kateterizasyon gibi instrümentasyonla ilişkilidir. Uzun süreli sonda kullanımı, antibiyotik kullanımı, anatomik yapı anomalisi bulunması üriner enterokok enfeksiyonları ve kolonizasyonu için risk faktörüdür (15,16). Piyelonefrit, komplike olmayan sistit, perinefritik apse veya prostatit etkeni olabilirler. Enterokokal üriner enfeksiyonlarda bakteremi gelişmediği sürece mortalite düşüktür (17).

Bakteremi ve Endokardit

Enterokoklar tüm enfektif endokarditlerin %5-15'inden sorumludur. En sık görülen tür *E. faecalis*'dir. Olguların çoğunda alta yatan kalp kapağı hastalığı veya prostatik kapak öyküsü vardır. Ancak enterokoklar anatomik olarak normal kalp kapaklarında da hastalık oluşturma yeteneğindedirler. Çoğunlukla sol taraf endokarditine neden olur ve mitral kapak, aort kapağına göre daha sık tutulmaktadır (2,18,19).

İntraabdominal ve Pelvik Enfeksiyonlar

İntraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar genellikle polimikrobiyaldir. Enterokoklar barsakta normalde bulunan diğer fakültatif ve anaerob bakterilerle birlikte etken olarak saptanmaktadır ve bu enfeksiyonlarda enterokokların esas rolünün ne olduğu açıklık kazanmamıştır. Siroz ve nefrotik sendromlu hastalarda spontan peritonit oluşturabilirler. Sürekli periton diyalizi yapılan hastalarda da peritonite neden olabilirler. Salpenjit, endometrit, sezaryen sonrası abse gelişimi gibi pelvik enfeksiyonlara neden olabilirler. Bu enfeksiyonlara bakteremi de eşlik edebilir (6,18).

Yara ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Enterokoklar, selülit ve yumuşak doku enfeksiyonlarına nadiren neden olmaktadır. Cerrahi yara enfeksiyonları, dekübitis ülserleri ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında çoğunlukla gram negatifler ve anaeroblarla birlikte izole edilirler. Enterokoklar nadiren diyabetik olan veya olmayan kişilerde kronik osteomyelitte neden olmaktadır (6,18).

Menenjit

Yenidoğan dönemi dışında enterokok menenjiti nadirdir. Genellikle santral sinir sisteminde anatomik bir defekt, geçirilmiş beyin cerrahi girişimi veya kafa travması gibi predispozan faktörlerin varlığında görülmektedir (22,23). BOS' ta $200 / \text{mm}^3$ den az lökosit vardır. Menenjit, enterokok endokarditli hastalarda gelişen baktereminin nadir bir komplikasyonu olarak da oluşabilir. AIDS ve akut lösemi dahil ciddi immün yetmezlikli hastalarda menenjit bazen enterokok bakteremisi tablosunu karıştırır. Bu durum yenidoğan sepsisinde de görülebilmektedir (6,18).

Solunum yolu enfeksiyonları

Geniş spektrumlu antimikrobiyal tedavi (özellikle sefalosporinler) ve enteral beslenme uygulanan hastalarda da nadiren enterokok pnömonisi gelişebilmektedir. Enterokokların neden olduğu solunum yolu enfeksiyonu sıklığının giderek arttığı bildirilmektedir (6).

Yenidoğan sepsisi

Yenidoğan sepsisi tablosu menenjit ve/veya bakteremi ile birlikte solunum güçlüğü, letarji ve ateşle karakterize bir tablodur. Uygun antibiyotik tedavisine iyi cevap vermektedir. Prematüre veya düşük doğum ağırlıklı bebeklerde, özellikle de nazogastrik tüple beslenme, intravasküler kateter bulunması gibi durumlarda

E. faecalis veya *E. faecium*'ün etken olduğu sepsis salgınları bildirilmiştir (6,18,20).

2.6. Antimikrobiyal Duyarlılık ve Direnç

Enterokoklar diğer gram pozitif mikroorganizmaların duyarlı olduğu pek çok antimikrobiyal ajana kısmen veya tamamen dirençlidir. Enterokok enfeksiyonlarının tedavisi klinikte karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir.

Enterokoklarda antimikrobiyal direnç intrinsek (kromozomal) ve ekstrinsek (kazanılmış) direnç olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir (Tablo2.3.)(6).

Tablo 2.3. Enterokoklarda antimikrobiyal direnç

Intrinsek Direnç	(kromozomal)	Aminoglikozid direnci (düşük düzeyde) Beta laktamlar (relatif olarak yüksek MİK değerleri) Linkozamidler (düşük düzeyde) Trimetoprim-sülfametaksazol (sadece in vivo) Quinupristin/dalfopristin (sadece <i>E. faecalis</i>)
Ekstrinsek Direnç	(kazanılmış)	Aminoglikozid direnci (yüksek düzeyde) Beta-laktamlar (PBP'lerde değişiklik) Hücre duvarı aktif ajanlar (tolerans) Florokinolonlar Linkozamidler (yüksek düzeyde) Makrolidler Penisilin ve ampisilin (beta laktamaz) Rifampin Tetrasiklinler Vankomisin Quinupristin/dalfopristin Linezolid

2.6.1. İntrensek (kromozomal) Direnç

Bu direnç tipi türe özgüdür ve tüm enterokok türlerinde bulunan kromozomal direnci ifade eder. Enterokoklar sefalosporinlere, penisilinlere, linkozamidlere ve aminoglikozidlere (düşük düzeyde) intrensek dirençlidir (21).

Beta-Laktam Antibiyotikler

Bütün enterokoklar , düşük ağırlıklı penisilin bağlayan proteinlere (özellikle PBP 5) azalmış afinite nedeniyle beta-laktam antibiyotiklere relatif direnç gösterirler. Özellikle *E.faecium*'da *E.faecalis*'e göre intrensek penisilin direncinde belirgin artış gözlenmektedir. *E. faecium* suşlarının %85–90' ı ampisiline dirençli iken *E. faecalis* suşlarında ampisilin direnci sadece %2–3 oranındadır. *E. Faecalis* suşları için penisilin MİK değerleri çoğu streptokok suşuna kıyasla 10 - 100 kat daha yüksektir. *E. faecium* için ise penisilin MİK değerleri *E. faecalis*' ten en az 4 - 16 kat daha yüksektir (22).

Aminoglikozidler

Enterokoklar düşük düzeyde aminoglikozid direnci gösterirler. Bu tip direnç bakteri duvarının bu grupta bulunan antibakteriyel ilaçlara karşı geçirgenliğinin az olmasından kaynaklanmaktadır.

Aminoglikozid grubu antibakteriyel ilaçlar, beta-laktam antibiyotik ya da vankomisin gibi hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotikler ile kombine edilecek olursa, zedelenen hücre duvarından bu gruptaki antibakteriyeller daha kolay geçeceğinden aminoglikozidlerin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri önemli ölçüde düşecektir. Enterokoklara karşı, beta-laktam veya glikopeptid grubu antibakteriyel ilaçlar ile aminoglikozid grubu ilaçların kombinasyonunun sinerjistik mekanizması bu şekilde açıklanmaktadır (23).

Trimetoprim – Sülfametoksazol

Enterokoklar in vitro olarak trimetoprim-sülfametoksazole duyarlı bulunsalar bile ekzojen folinik asit, dihidrofolat ve tetrahidrofolatı kullanabildiklerinden bu ajan in vivo olarak etkisizdir (24).

Linkozamidler

Enterokoklar linkozomid grubu antibiyotiklere de düşük düzeyde intrensek olarak direnç göstermektedirler (24).

Quinupristin/dalfopristin

E. faecalis intrensek olarak quinupristin/dalfopristin dirençlidir.

2.6.2. Ekstrensek (kazanılmış) Direnç

Kazanılmış direnç genellikle bir DNA mutasyonu ya da yeni bir DNA segmentinin transferi sonucunda gelişmektedir. Bu mutasyon sonucu oluşan dirençli genler enterokok suşları arasında veya başka mikroorganizmalara transfer edilebilmektedir. DNA segmenti transferi en sık konjugasyon yolu ile olmaktadır (25).

Kloramfenikol

Yapılan çeşitli çalışmalarda enterokokların %20–42' sinin kloramfenikole dirençli olduğu ve dirençten en sık sorumlu mekanizmanın kloramfenikol asetil transferaz üretimi olduğu bildirilmektedir (22).

Eritromisin Direnci

Genellikle rRNA' nın metilasyonundan sorumlu ermB geni ile ilişkilidir. Metilasyon nedeniyle eritromisin ribozomlara bağlanamaz. Aynı mekanizma, klindamisine yüksek düzeyde dirençten de sorumludur. ermB geni, Tn917 transpozonunun bir parçası olarak çeşitli plazmidler üzerinde taşınabilmektedir (22).

Tetrasiklin Direnci

Enterokoklarda tetrasiklin grubu antibiyotiklere dirençten sorumlu olan çok sayıda gen tanımlanmıştır. Bunlardan *tetM* *tetO* ve *tetN* tetrasiklinlerin ribozomlar üzerindeki etkisini inhibe eder. *tetL* geni ise enterokokal bir plazmid üzerinde taşınır. Bu direnç geni mikroorganizma tetrasiklinle karşılaştığında amplifiye olur. *tetL* geni tetrasiklinlerin hücre dışına pompalanmasını sağlayan aktif transport sistemini kodlar (22).

Beta-laktam Antibiyotikler

Beta-laktamaz üreten enterokok suşları yaygın değildir ve oluşturdukları enfeksiyonların tedavisinde fazla klinik zorluk yaşanmamaktadır (6). Beta-laktamaz oluşturan suş ilk olarak 1981 yılında ABD’de tanımlanmıştır (18). Ülkemizde yapılan çalışmalarda beta-laktamaz üretimi bildirilmemiştir (26).

E. faecalis suşlarında beta-laktamaz daha sıktır. DNA hibridizasyon çalışmaları enterokok suşlarının ürettiği beta-laktamaz enziminin *S. aureus* ’un plazmid kaynaklı beta-laktamazı ile idantik olduğunu göstermiştir. Ancak üretimi devamlıdır. Çünkü indüklenebilir beta-laktamaz üretimini kontrol eden genler enterokoklara transfer edilememektedir. Beta-laktamaz üreten suşlarla belirgin bir MİK artışı gözlenmez. Nitrosetin testi gibi bir beta-laktamaz testi kullanılarak bu suşlar tanımlanabilir. Beta laktamaz üreten enterokok suşlarının büyük çoğunluğunda, yüksek düzeyde gentamisin direnci de tespit edilmiştir (27). Yapılan araştırmalarda beta laktamazı ve aminoglikozidleri inaktive eden enzimleri kodlayan genlerin, aynı plazmid üzerinde bulunduğu gösterilmiştir (28).

Sonradan kazanılmış direncin önemli bir şekli de hücre duvarı aktif ajanlara karşı gelişen toleranstır. Enterokok izolatlarının çoğu beta laktamlara, vankomisin ve teikoplanin de dahil diğer hücre duvarına etkili ajanlara karşı tolerans göstermektedir. Kısa süreli maruziyet, hızla tolerans kazanılmasına ve bu ajanların enterokoklara karşı bakteriyostatik etki oluşturmalarına neden

olmaktadır. Üriner sistem enfeksiyonlarında tek başına kullanılabilirler de menenjit, endokardit gibi bakterisidal etki gereken olgularda bir aminoglikozid ile kombine edilerek sinerjistik bakterisidal etki sağlanmaktadır (12).

Aminoglikozid Antibiyotiklere Karşı Yüksek Düzeyde Direnç

Aminoglikozid grubu antimikrobiklere karşı yüksek düzeyde direnç ribozomal mutasyon veya plazmid kaynaklı aminoglikozid modifikasyonu yapan enzim üretimi ile oluşmaktadır.

Yüksek düzeyde gentamisin direncinden en fazla sorumlu enzim 6' asetiltransferaz –2' fosfotransferazdır. Bu tür dirençte streptomisin dışında sık klinik kullanımı olan aminoglikozidlere de direnç söz konusudur. Streptomisini modifiye eden 6' adeniltransferaz gibi enzimleri kodlayan gen içeren enterokoklar hücre duvarı aktif antimikrobikler ve aminoglikozidlerin tüm kombinasyonlarına dirençlidir. Gentamisin direncinden sorumlu APH(2')-I_d ve APH(2')-I_c enzimleri de bütün beta-laktam ve gentamisin sinerjisini ortadan kaldırmaktadır (2,18).

Glikopeptid Antibiyotikler

Normal koşullarda enterokoklarda peptidoglikan sentezi için 2 D - alanin molekülü bir ligaz enzimi tarafından birbirine bağlanarak D–ala–D–ala oluşturulmaktadır. D–ala–D–ala UDP–N-asetil muramil-tripeptide eklenerek UDP N-Asetil muramil-pentapeptidin oluşması ve bunu da transglikozilasyon yoluyla mevcut peptidoglikana eklenmesi takip etmektedir. Son olarak da transpeptidaz enzimi aracılığıyla UDP N-Asetil muramil-pentapeptidler arasında çapraz peptid bağları oluşturulmaktadır (29).

Glikopeptid antibiyotikler hücre duvarı sentezinde peptidoglikan polimerlerini oluşturacak prekürsörlerin D-ala-D-ala terminal ucuna bağlanarak çoğalmakta olan peptidoglikan zincirlerinde eklenmelerini ve çapraz peptid bağlarının oluşmasını engelleyerek etki göstermektedir (30).

Gram negatif bakteriler intrensek olarak glikopeptidlere dirençlidirler. Büyük, rijid ve hidrofobik olan bu moleküller gram negatif bakterilerin hücre dışı membranlarını aşamazlar. Ayrıca gram pozitif bakteriler arasında *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* türleri ile *Erysipelothrix rhusiopathiae* glikopeptidlere intrensek olarak dirençli bakterilerdir.

Enterokoklarda glikopeptid antibiyotiklere direnç, ilk kez 1988 yılında Uttley ve ark.adaşları tarafından bildirilmiş ve daha sonra tüm dünyada görülmeye başlanmıştır (31).

Enterokoklardaki vankomisin direnci bakterinin yeni bir ligaz enzimi aracılığıyla D-ala-D -ala distal ucunun yapısını değiştirmesi ve ilacın buraya bağlanmasının engellenmesi ile oluşmaktadır. Kazanılmış glikopeptid direncinde şimdiye kadar VanA, VanB, VanD, VanE ve VanG olmak üzere 5 farklı fenotip tanımlanmıştır. VanC tipi direnç ise intrensek bir direnç türüdür VanA, VanB, ve VanD tipi direnç; D-ala-D-ala-laktat, VanC ve VanE tipi direnç ise D-ala-D-ala-serin üretimi ile ilişkilidir (10).

Van A tipi direnç

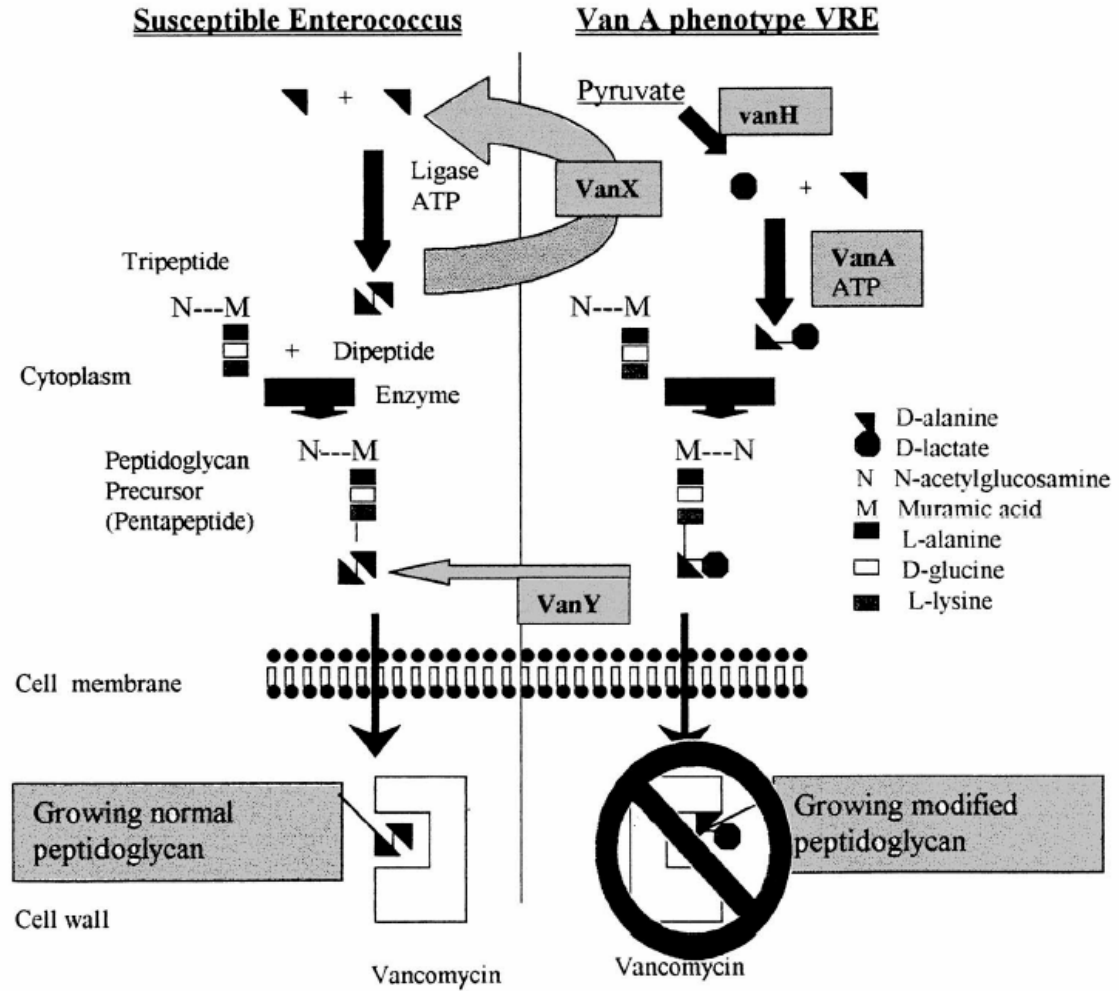
VanA tipi direnç en sık karşılaşılan dirençtir. Hem vankomisine (MIC \geq 64 μ g/ml) hemde teikoplanine (MIC \geq 16 μ g/ml) yüksek düzeyde direnç mevcuttur. Bu dirençten esas olarak Tn1546 transpozonu ve bu transpozonla ilişkili elemanlar üzerinde taşınan *vanA* gen kümesi sorumludur.

Vankomisin direncinin regülasyonu ve oluşumunda rol alan van A operonu 9 adet geni kodlamaktadır. Bunlar *orf1* ve *orf2* (transpozisyonundan sorumlu), *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX*, *vanY*, *vanZ* genleridir. Bu genlerin ekspresyonu sonucunda peptid yan zincirleri D-ala-D-ala yerine Dala- D-ala-laktat ile sonlanan anormal peptidoglikan prekürsörleri sentezlenir. Vankomisin bu anormal dipeptide düşük affinite gösterir ve yeteri kadar bağlanamaz (29). *vanR* ve *vanS* iki komponentli düzenleyici bir sistem oluşturur ve *vanH*, *vanA* ve

vanX'in transkripsiyonunu düzenler. *vanS* ortamda vankomisin varlığı veya etkisini saptar ve bu sinyali *vanR*'ye aktarır. *vanR* aktive olduğunda *vanH*, *vanA* ve *vanX*, genlerinin transkripsiyonu gerçekleşir. Bir dehidrojenaz olan *VanH*, D-lac oluşumunu sağlar. Ligaz olan *VanA* bunu D-ala-D-ala-lac sentezinde substrat olarak kullanır. *vanZ*'nin fonksiyonu tam olarak bilinmemekte, ancak teikoplanin direncinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Van A fenotipinin ekspresyonu için bulunması şart değildir (32,33,34).

İndüklenebilir VanA direncinde yalnızca vankomisin varlığında, PBP lerin artışı sonucunda beta - laktam antibiyotiklere karşı hipersensitivite meydana gelmektedir. Bu da vankomisin dirençli enterokokların tedavisinde vankomisin – beta - laktam kombinasyonunun başarısını açıklamaktadır (23).

Van A ligaz geni *Corynebacterium spp.*, *Arcanobacterium haemolyticum*, ve *Lactococcus spp* gibi enterokok dışı türlerde de saptanmıştır.



Şekil 2.1. Enterokoklardaki glikopeptid direncinin mekanizması

Van B tipi direnç:

VanB tipi glikopeptid direnci VanA ligaza yapısal olarak benzerlik gösteren VanB ligazı ile oluşmaktadır. Van B proteini D-ala-laktat ile sonlanan peptidoglikan prekürsörleri sentezini sağlar (35). Ligaz geni kromozomal yerleşimlidir, ancak transpozon (Tn 1547, Tn 5382) veya plazmid üzerinde transfer edilebilir (36). *vanA*'da mevcut genlerden altı tanesi *vanZ* hariç VanB'de mevcuttur. *vanB* gen kümesinde görevi tam olarak anlaşılamayan *vanW* geni mevcuttur. Bu tip dirence sahip suşlar vankomisine değişik düzeylerde direnç gösterir (MİK 4 - 1024 µg/mL), teikoplanine ise duyarlıdırlar (MİK 0.5-2 µg/mL).

Direnç sadece vankomisin tarafından indüklenebilmektedir. Vankomisin ile indüklenen kökenler teikoplanine de direnç gösterebilirler. Van A'dan farklı olarak VanB tipi direnç sadece *E. faecium* ve *E. faecalis*'te saptanmıştır .

VanC tipi direnç

VanC tipi direnç, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* türlerinde görülen intrensek bir direnç türüdür. vanC gen kümesi D-ala–D-ser ile sonlanan peptidoglikan prekürsörlerinin sentezinden sorumludur. Bu direnç türünün üç alt tipi bulunmaktadır: VanC-1, VanC-2, VanC-3. Bu genlerin türe spesifik olduğu düşünülmektedir (*E.gallinarum-vanC-1*, *E.casseliflavus-vanC-2* ve *E.flavescens-vanC-3*). VanC tipi dirence sahip olan suşlar teikoplanine duyarlıdır. Yapısal olarak indüklenemez ve transfer edilemezler (10).

Van D tipi direnç

İlk kez 1991 yılında bir *E. faecium* suşunda tanımlanmış bir direnç tipidir . VanD geni kromozomal bir lokalizasyona sahiptir ve transfer edilemez. VanD tipi direnç taşıyan suşlar vankomisine (MİK=64-256 µg/ml) ve teikoplanine (MİK=4-32 µg/ml) dirençlidir. *E. faecium* BM4339 üzerinde yapılan çalışmalar, peptidoglikan prekürsörün D-ala-laktat ile sonlandığını göstermiştir. Direnç mekanizmasının VanA ve VanB ye benzerdir. Van D ligaz %67 oranında Van A ve Van B ligaz ile benzerik göstermektedir. Ancak VanD suşlarında D,D-dipeptidaz aktivitesi saptanmamıştır, karboksipeptidaz aktivitesi ise düşük düzeydedir. D,D-dipeptidaz aktivitesi bulunmamasına rağmen *vanD* gen kümesi *vanXD*, *vanRD*, *vanSD*, *vanHD* genlerini içermektedir (37,38).

VanE tipi direnç:

E. faecalis BM4405 izolatında tanımlanmıştır. Düşük düzeyde vankomisin direnci (MİK 16mg/mL) vardır. Teikoplanine duyarlıdır (MİK 0.5 mg/mL). *vanE* geni kromozom üzerine lokalizedir ve transfer edilemediği bilinmektedir. Bu direnç fenotipi VanC tipi dirence benzerlik gösterir. Vankomisin direnci D-ala-D-

ser ile sonlanan peptidoglikan prekürsörlerinin sentezi ile ilişkilidir. Ancak VanE tipi direncin genetik belirleyicisi farklıdır ve intrensek bir direnç tipi değildir. VanE ligazın amino asit dizilimi Van C ligazı ile (55%) VanA ligazı ile (45%), VanB ligazı ile (43%), ve VanD ligazı ile (44%) oranında benzerlik göstermektedir (39).

Van G tipi direnç

Bu direnç tipi *E. faecalis* WCH9 suşunda tanımlanmıştır. Bu suş vankomisine düşük düzeyde (MİK=16µg/ml) dirençli, teikoplanine duyarlıdır (MİK=0,5 µg/ml). Bu direnç tipi transfer edilemez. *van G* gen kümesinin ürünü diğer *van* genlerinin ürünlerine %50 den daha az amino asit dizilim benzerliği göstermektedir (40).

Tablo 3.1. Enterokoklarda glikopeptid direnç fenotiplerinin özellikleri

	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE	VanG
Peptidoglikan prekürsör	D-ala-D-ala-Lac	D-ala-D-ala-Lac	D-ala-D-ala-Ser	D-ala-D-ala-Lac	D-ala-D-ala-Ser	D-ala-D-ala-Lac
Ligaz geni	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC1, vanC2, vanC3</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>
Direnç geninin kaynağı	kazanılmış	kazanılmış	yapısal	kazanılmış	kazanılmış	kazanılmış
Vankomisin MiK mg/L	64– >1000	4–>1000	2–32	64-256	16	16
Teikoplanin MiK mg/L	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.gallinarum</i> <i>E.durans</i> <i>E.mundtii</i> <i>E.avium</i>	<i>E.faecalis</i> <i>E.casseliflavus</i> <i>E.gallinarum</i> <i>E.faecium</i>	<i>E.gallinarum</i> <i>E.casseliflavus</i> <i>E.flavescens</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E faecalis</i>
Transfer eilebilirlik	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır

Vankomisine Bağımlı Enterokoklar (VDE)

Bu ilginç fenomen hem *E. faecalis* hem de *E. faecium*'da tanımlanmıştır. Bu suşlar hem vankomisine dirençlidir hem de vankomisin olmadan üreyememektedir. İlk suş 1993 yılında uzun süre hastanede yatan geniş spektrumlu antibiyotik kullanmış bir hastanın idrar kültüründen üretilmiştir. Bu vakadan sonra Van A ve Van B tipi VDE'ler de bildirilmiştir. Bildirilen tüm vakaların ortak özelliği vankomisin veya geniş spektrumlu bir antibiyotik kullanma öyküsünün bulunmasıdır. Bu fenomen bakterinin doğal ligaz genlerinde mutasyon sonucu D-ala-D-ala sentezi yapılamadığı, ancak vankomisin varlığında Van A veya Van B ligazı kullanılarak hücre duvarı yapımında D-ala-D-lac kullanıldığı şeklinde açıklanmaktadır (41,42).

2.7. Enterokok Enfeksiyonlarında Tedavi

Klasik antibiyotiklere dirençli olmaları, hem de duyarlılık tespitinde özel teknikler gerekmesi nedeniyle enterokok enfeksiyonlarının tedavisi komplikedir. Penisilin-aminoglikozid sinerjisine direnç ve beta-laktamaz üreten suşların çoğunda da penisilin ve ampisilin direnci standart duyarlılık testleriyle saptanamaz. Bu nedenle izole edilen etkenler yüksek düzeyde aminoglikozid (YDAG) ve beta laktamaz varlığı açısından test edilmelidir.

Penisilin veya ampisilin, peritonit, yara ve üriner sistem enfeksiyonlarında bakterisidal tedavide yetersiz kalabilir. Yüksek düzeyde penisilin direncine sahip suşlarla olan enfeksiyonlarda ve penisiline allerjisi olanlarda vankomisin veya teikoplanin kullanılabilir. Çoğu enterokok suşu nitrofurantoin duyarlı olduğundan üriner sistem enfeksiyonlarında nitrofurantoin kullanımı ile başarılı sonuçlar alınmaktadır.

Enterokoklara karşı in vitro aktivitesi olan fosfomisin ve florokinolonlar da bazı üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılabilir. Levofloksasin, gatifloksasin ve moksifloksasin enterokoklara karşı in vitro olarak siprofloksasinden daha fazla

etkilidir. Fakat bu ajanların aktiviteleri siprofloksasine dirençli suşlarda azalmaktadır. Eritromisin ve diğer makrolidler de enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilir. Ancak özellikle ABD'de suşların %80-90'ında eritromisin direnci mevcuttur. Enterokok suşlarına karşı sadece bakteriyostatik etki gösteren tetrasiklin ve kloramfenikol de alternatif ajanlardır (6,18).

Endokardit ve menenjitte kombine tedavi uygulanmalıdır. Komplike olmayan bakteremilerde eğer altta yatan ciddi bir hastalık yoksa monoterapi yeterli olabilir. Penisilin ve gentamisin kombinasyonu en sık tercih edilen kombinasyondur. Penisilin yerine ampisilin, gentamisin yerine de streptomisin tercih edilebilir. Penisilin allerjisi varsa penisilin yerine vankomisin kullanılmalıdır. Çoğu olguda 4 haftalık kombine tedavi yeterli olmaktadır. Prostatik kapağı olan veya kısa süreli tedavi sonrası relaps görülen hastalarda 6 haftalık uygulama gerekebilir. Benzer tedavi yaklaşımı menenjitli hastalara da uygulanabilir. Ancak optimal tedavi süresi tam olarak kesinlik kazanmamıştır. İki veya üç haftalık uygulama ile iyi yanıt alınmaktadır. VRE menenjitinde BOS penetrasyonunun iyi olması nedeniyle linezolid faydalı olabilir.

Yüksek düzeyde gentamisin direnci olan enterokoklarla oluşan menenjit veya endokarditte, yüksek düzeyde streptomisin direnci saptanmamışsa hücre duvarı aktif ajan ve streptomisin kombinasyonu kullanılabilir. Streptomisin ve gentamisine yüksek düzeyde dirençli suşlarla oluşan endokarditte intravenöz infüzyon şeklinde ampisilin 8-12 hafta uygulanabilir. Bu tür olgularda enfekte kapakların cerrahi eksizyonu gerekebilir.

Yüksek düzeyde penisilin direnci saptanan *E. faecium* suşlarıyla oluşan enfeksiyonlarda vankomisin kullanılmalıdır. Çoğu VRE penisilin ve ampisiline relatif olarak duyarlıdır ve tedavide denenebilir (6).

VRE izole edilen hastalarda tedaviye başlamadan önce, kolonizasyon-enfeksiyon ayırımı yapılmalıdır. Lokal veya sistemik enfeksiyon bulgusu olmayan hastada yüzeysel alanlardan, değiştirilen intravasküler kateterlerden,

intraperitoneal ve safra drenlerinden ve piyüri olmadan idrardan VRE izole edildiğinde, kolonizasyon olarak değerlendirilmelidir ve antibakteriyel tedaviye gerek yoktur (43).

Hem penisiline yüksek düzeyde dirençli hem de vankomisine dirençli suşlarla oluşan enfeksiyonlarda hayvan modellerinde ampisilin, vankomisin ve gentamisin kombinasyonu ile bakterisidal etki oluşturduğu gösterilmiş ancak klinik etkinliği kanıtlanmamıştır. Van B fenotipi VRE'ler in vitro teikoplanine duyarlı olsalar da tedavi sırasında bu ajana direnç geliştirebildiğinden endokardit olgularında teikoplanin ve aminoglikozid kombinasyonu tercih edilmelidir (6,44).

Özellikle VRE enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotik duyarlılık testleri yapılarak quinupristin/dalfopristin ve linezolid kullanılabilir. Bu ajanlar enterokok suşlarına bakteriyostatik etkilidir. *E. faecalis* quinupristin/dalfopristine intrinsek olarak dirençlidir. *E. faecium* enfeksiyonlarında quinupristin/dalfopristine cevap hızı % 65-75 arasındadır. Tedavi sırasında bu ajana direnç gelişme olasılığı nedeniyle ciddi enfeksiyonlarda doksisisiklin tedaviye eklenebilir (6,45,46).

Daptomisin ve oritavansin VRE enfeksiyonları için gelişim aşamasında olan bakterisidal ajanlardır (6).

2.8. VRE ile Kolonizasyon ve Enfeksiyon

Enterokoklarda vankomisin direncinin gelişmesi ve enterokokların penisilin ve aminoglikozidlere karşı da yüksek direnç kazanmaları, bu mikroorganizmalara bağlı enfeksiyonları tedavi etmeye çalışan klinisyenlere büyük güçlükler çıkarmaktadır. Tedavi seçenekleri sıklıkla antimikrobiyal kombinasyonların sınırlı olmasıyla veya deneysel ortamda henüz etkinliği kanıtlanmamış bileşikler nedeniyle sınırlanmış durumdadır.

Birçok merkezde kolonizasyonun VRE ile enfekte olmuş hastalardan çok iyileşen hastalarda olduğu görülmüştür (47,48,49). VRE taraması yapılan yüksek

risk grubunda kolonize hastaların enfekte hastalara oranı 10/1 şeklindedir (48,49).

VRE enfeksiyonları genelde yatalak, immün düşkün, altta ciddi bir hastalığı olan ve hastanede yatmakta olan hastalarda ortaya çıkmaya meyillidir. VRE bakteremisi görülen hastalarda mortalite oranları %60-70 düzeylerine ulaşabilmektedir (48,49). Linden ve ark.'ları karaciğer transplantasyonunda enterokok ilişkili mortalitenin VRE bakteremisiyle birlikte yaklaşık %46 olduğunu rapor etmişlerdir. Bu durum vankomisine duyarlı enterokokal bakteremi nedeniyle ölenlerden önemli oranda yüksektir (%25) (52). Diğer çalışmalarda VRE ve vankomisine duyarlı enterokok ile enfekte hastaların kıyaslanmasında mortalite açısından önemli bir fark bulunamamıştır. Aynı enterokokal tür için VRE'nin vankomisin duyarlı suşa göre daha virulan olduğuna dair bir kanıt yoktur. Bazı serilerde bir çok nozokomial enterokok bakteremisinin polimikrobiyal olmasına rağmen VRE bakteremisinin %80-90 oranında monomikrobiyal olduğu bildirilmektedir (50,52).

VRE sıklıkla kateter ilişkili bakteremi etkenidir. Ayrıca idrardan intraabdominal abseden, cerrahi saha enfeksiyonundan veya batınla ilişkili direnlerden izole edilebilir. Nadiren de cerrahi veya diğer enstruman uygulamalardan sonra plevral sıvıdan ve BOS tan izole edilebilir (53).

Rutin kültürlerde VRE'nin klinik önemini belirleyebilmek veya enfeksiyondan kolonizasyonunu ayırabilmek zordur. Bu durum özellikle idrar örnekleri veya VRE polimikrobiyal enfeksiyonun bir parçası olduğu durumlarda geçerlidir. Bazı vakalarda tedavi endikasyonu yoktur. VRE nin ne boyutta bir mortalite ve morbidite sebebi olduğunu tespit edebilmek zordur çünkü birçok hastada çok ciddi şekilde mortalite ve morbiditeye neden olan altta yatan bir hastalık vardır ve buna ek olarak VRE sıklıkla diğer potansiyel mikroorganizmalarla birlikte miks kültür içinde yer almaktadır (54).

VRE hakkındaki epidemiyolojik bilgilerin çokluğuna rağmen en önemli rezervuarı hakkında fikir birliğine varılamamıştır. Önce gastrointestinal sisteminde VRE taşıyan hastanede yatan astaların majör rezervuar olduğu düşünülürdü. Birçok kolonize hasta asemptomatik ve risk grubundaki hastalarda bir sürveyans çalışması yapılmazsa bu rezervuar kolaylıkla gözden kaçabilirdi (54). Gastrointestinal sistem *E. faecium* için majör rezervuardır. Ancak fekal kolonizasyon olmayan hastalardan elde edilen pozitif klinik örneklerin varlığı direkt eksojen yayılımın gastrointestinal kolonizasyon ve endojen enfeksiyondan daha sık gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Bir çalışmada vankomisin dirençli *E. faecium* gastrointestinal kolonizasyonu olan ciddi karaciğer hastalarının %33 ünde pozitif boğaz sürüntülerine rastlanmıştır (55). Bu bölgedeki kontaminasyonun sebebi ağız, trakeotomi veya endotrakeal tüp bakımı sırasında olan uygulamalar olabilir. Orofarengeal kolonizasyon çapraz kolonizasyon için bir kaynak oluşturabilir. Bu durum özellikle çalışan personelin ellerini yıkamaması durumunda ortaya çıkarmaktadır (10).

VRE ile kolonize hastanın odasındaki çevresel yüzeyler ve tıbbi araçlar sıklıkla VRE ile kontamine olmakta ve hastane içinde organizma için birer rezervuar görevi görmektedirler. Rezervuar olabilecek objeler arasında hasta elbiseleri, yataklar, yerler, kapı kolu, banyolar, şeker ölçüm cihazları, tansiyon aleti, termometreler, EKG monitörleri, intravenöz pompalar sayılabilir (56-61). VRE'ye bağlı yaygın çevresel kontaminasyon özellikle diyaresi olan hastaların odasında görülmektedir. Bazı çalışmalarda kolonizan veya etken olarak soyutlanan suşlarla, hasta odalarındaki kontamine yüzeylerde saptanan VRE suşlarının identik oldukları gösterilmiştir (56). Bu organizmaların kuruluğa ve yüksek ısıya karşı dirençli olmaları bu tip yüzeylerde günlerce hatta haftalarca canlı kalmalarını sağlamaktadır. Vankomisine dirençli *E. faecium*, kolonize olan hasta taburcu olduktan 4 gün sonra turnikeden hatta birkaç gün depoda beklemiş olan intravasküler ekipmanlardan izole edilebilmiştir (47,49,52).

Montecalvo ve ark.'ları hastaların haftalarca hatta aylarca VRE ile kolonize kaldıklarını söylemişler ve sıklıkla hastaneye tekrar kabulleri sırasında da hala kolonize durumda olduklarını bildirmişlerdir. Green ve ark.'ları VRE taşıyan karaciğer transplantasyonu yapılmış hastaların yaklaşık %60 ında kolonizasyonun 12 hafta ve daha fazla sürdüğünü bildirmişlerdir (85). Nadiren de hastalarda bir yıl boyunca VRE kültür pozitifliğinin sürdüğü bildirilmiştir(78). Montecalvo ve ark. bazı hastaların persistant olarak aynı VRE suşuyla kolonize olduklarını PFGE ile göstermişlerdir(62).

VRE kolonizasyonu ve/veya enfeksiyonu için risk faktörlerini araştıran pek çok çalışma vardır. Bu çalışmaların sonuçlarına göre risk faktörleri üç ana kategoride toplanabilir (63-67).

1- Hastaya ait faktörler: Kronik böbrek yetmezliği, malignite, nötropeni, diabetes mellitus, geçirilmiş intraabdominal cerrahi, organ transplantasyonu, APACHE II skorunun yüksek olması, *C. difficile*'e bağlı kolit, hepatobiliyer hastalık gibi hastanın altta yatan hastalığının ağırlığı ile ilgili faktörlerdir.

2- Demografik risk faktörleri:Hastanede yatış süresinin uzun olması, yoğun bakım, diyaliz, transplantasyon, hematoloji - onkoloji ünitelerinde yatış, VRE ile kontamine ekipmanlara maruziyet, VRE li hastalarla temas veya VRE ile kontamine olmuş tıbbi aletlere maruz kalma gibi hastane ile ilgili faktörlerdir

3- Antibiyotik kullanımı: Daha önceden vankomisin, 2. - 3. kuşak sefalosporin, metronidazol, klindamisin, imipenem,tikarsilin klavulonik asit gibi antimikrobialleri kullanma ve kullanma süresinin de önemli risk faktörü olduğu bildirilmiştir.

2.8.1. Nozokomiyal VRE Kontrolü

Son yıllarda enterokoklardaki vankomisin direncinde gözlenen artış nedeniyle VRE yayılımının önlenmesi ve korunma amaçlı 1995 yılında Hospital

İnfection Control Practices Advisory Committee” (CDC / HICPAC) tarafından bazı önerilerde bulunulmuştur. Bu önerilerde 4 nokta vurgulanmıştır.

1. Uygun vankomisin kullanımı
2. Hastane personelinin eğitimi
3. Mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı
4. Kontrol önlemlerinin uygulanması

Uygun Vankomisin Kullanımı

Vankomisin kullanımının VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu için bir risk faktörü olduğu bir çok çalışma ile kanıtlanmıştır. Ayrıca, uygunsuz vankomisin kullanımının *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarında vankomisine direnç gelişimine (VRSA ve VRSE) ve yayılımına zemin hazırlayacağı düşünülmektedir (68).

Vankomisin kullanımının uygun olduğu durumlar

1. Beta-laktam antibiyotiklere dirençli gram-pozitif mikroorganizmaların neden olduğu ciddi enfeksiyonlar
2. Beta-laktam antibiyotiklere karşı hayati tehlike yaratacak düzeyde allerjisi olan kişilerde gram-pozitif mikroorganizmalarla gelişen enfeksiyonlar
3. Metronidazole yanıt vermeyen veya çok ağır seyreden antibiyotiğe bağlı ishal olguları
4. American Heart Association önerilerine uygun olarak enfektif endokardit profilaksisi
5. MRSA veya MRSE enfeksiyonlarının oranının yüksek olduğu merkezlerde protez veya cihaz implantasyonu içeren büyük cerrahi girişimler (kardiyak veya vasküler girişimler, total kalça replasmanı vb) öncesinde

profilaktik olarak kullanılabilir (Maksimum iki dozdan sonra profilaksi sonlandırılmalıdır).

Vankomisin kullanımının uygun olmadığı durumlar

1. Rutin cerrahi profilaksi
2. MRSA oranı yüksek olmayan hastanelerde, febril nütropenik hastalardaki ampirik tedavi
3. Diğer kan kültürlerinin negatif olduğu durumlarda kan kültüründeki tek bir MRSE pozitifliği
4. Ampirik başlanan vankomisin tedavisine kültürde beta-laktam dirençli mikroorganizma izole edilmemiş olmasına rağmen devam edilmesi
5. Periferik veya santral vasküler kateteri olan hastalarda kolonizasyon veya enfeksiyon gelişimini önlemek amacıyla profilaktik kullanım
6. Gastrointestinal sistemin selektif dekontaminasyonu
7. Antibiyotiğe bağlı ishal olgularının primer tedavisi
8. MRSA kolonizasyonunun eradikasyonu
9. Düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlarda rutin profilaksi
10. Devamlı ayaktan periton diyalizi veya hemodiyaliz uygulanan hastalarda rutin profilaksi
11. Böbrek yetmezliği olan hastalarda beta-laktam antibiyotiklere duyarlı enfeksiyonların tedavisi
12. Vankomisin içeren solüsyonların irrigasyon amacıyla ya da topikal olarak uygulanması

Eğitim programı

VRE yayılımının önlenmesinde eğitim en önemli faktörlerden biridir. Hemşire, laboratuvar personeli, eczacı, konsültan ve asistan doktorlar, öğrenciler, temizlik işlerinden sorumlu personel ve hasta bakımı ile ilgili diğer tüm personeli kapsayacak şekilde devamlı bir eğitim programının yürütülmesi gereklidir. Eğitim programında öncelikle VRE nin neden önemli olduğu (maliyet, tedavi güçlüğü vb) açıklanmalı, ayrıca VRE epidemiyolojisi ve kontrol yöntemleri hakkında bilgi verilmelidir (68).

Mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı

VRE ile kolonize veya enfekte hastaların erken tespiti bir hastane için nozokomiyal yayılımı önlemek adına gerekli ve zorunlu bir durumdur (54). VRE'nin hastane içinde yayılımını önlemede mikrobiyoloji laboratuvarı ilk savunma basamağıdır. Bir laboratuvarın enterokokları identifiye edebilmesi, vankomisin direncini acil ve kesin olarak tespit edebilmesi VRE kolonizasyonunun ve enfeksiyonunun önlenmesi açısından çok önemlidir. Bunlara ek olarak laboratuvar ile enfeksiyon kontrol komitesi arasındaki koordinasyon bu çalışmalarını kolaylaştırır. Hastanede VRE ile bir defa karşılaşıldıktan sonra enterokok bulunan tüm sahalar (steril olmayan alanlar) için vankomisin duyarlılık testleri yapılmalıdır. Henüz VRE ile karşılaşmamış ancak aynı coğrafik bölgelerde bulunan hastaneler tüm enterokokal izolatlar için duyarlılık testleri yapmalıdırlar (68).

VRE kolonizasyonunu tespit etmek için farklı seçici besiyerri kullanılmaktadır. Kullanılan standart bir yöntem olmamasına karşın, gerek enterokokosel-vankomisin broth gerekse brain-heart infüzyon (BHI)-vankomisin agar, VRE'nin fekal örneklerden hızlı ve selektif izolasyonunu sağlayan yöntemler olarak bildirilmektedir (69-71).

VRE tespiti için vankomisin duyarlılığını kesin olarak tespit edebilecek testler kullanılmalıdır. CLSI önerilerine göre disk difüzyon yöntemi ile orta

derecede duyarlı olarak değerlendirilen bir izolat için mutlaka vankomisin MİK değeri saptanmalı ve bu izolat tür düzeyinde identifiye edilmelidir.

Disk difüzyon yöntemi kullanan laboratuvarlar plakları 24 saat boyunca inkübe etmelidirler. MİK değerleri agar dilüsyon, agar gradient dilüsyon (E-test), makro veya mikro broth dilüsyon metodlarıyla tespit edilebilir. Bu yöntemlerde de inkübasyon 24 saat olmalıdır (72-73).

Otomatize sistemler VRE tespitinde özellikle de VanB direncini belirlemede güvenilir değildir. Son dönemde çıkan kesinliği kanıtlanmış 8 test vardır (agar dilüsyon, disk difüzyon, E-test, agar tarama plak, Vitek GPS-TA ve GPS-101). Bu testlerin tümünün VanA direncini tespit ettiği ancak VanB direncinin Vitek GPS-TA ve MicroScan rapid (sensitivitesi %47-53) ile sıklıkla tespit edilemediği gösterilmiştir (74). E-test dışındaki tüm metodlar ve agar tarama hala VanC1 ve VanC2 de problem çıkarmaktadır. Eğer VanA, VanB, VanC1 ve VanC2 ortalama direnç tespiti gerekiyorsa agar tarama rutin için en kolay ve güvenilir testtir. Yeni Vitek GPS-101 Vitek GPS-TA ile kıyaslandığında önemli bir özgüllük kaybı yaratmadan yüksek bir duyarlılık göstermektedir (74). Bir klinik örnekte VRE tespit edildiği zaman vankomisin direnci önerilen antimikrobiyal duyarlılık testleriyle doğrulanmalıdır. Doğrulama duyarlılık testleri hazırlanırken hastanın primer bakıcısı, hasta ile ilgilenen personel ve enfeksiyon kontrol komitesi acilen uyarılmalı izolasyon ve önlemlerin alınması sağlanmalıdır. Ön raporu sonuç raporu takip etmelidir (68).

Enterokoklarda vankomisin direnç tespiti için kullanılabilecek bir diğer yöntem de PCR ile glikopeptid direncinden sorumlu genin saptanmasıdır (73-75). Bu tip testler özellikle vankomisine düşük direnç gösteren VanB, VanC tipi direnci belirlemede faydalı olabilir. VRE izolatlarının teikoplanine karşı olan duyarlılıklarını tespitte disk difüzyon testini kullanmak sıklıkla VanA ve VanB suşları arasındaki farkı ortaya koyabilecektir. Buna rağmen nadiren de olsa teikoplanine dirençli VanB tipi suşlarda rapor edilmiştir. VRE için yapılan sürveyans kültürleri laboratuvarlar için zaman alıcı ve pahalıdır. Son

zamanlarda bazı hastanelerde PCR'ın VRE sürveyans kültürleri için maliyet-etkin olduğu bildirilmiştir (76).

VRE'nin hastanede yayılımının tek bir suşla mı yoksa birkaç farklı klonun aynı anda ortaya çıkmasıyla mı olduğunu tespit edebilmek önemlidir. Bu durum kontrol öncelik tespitinde önem taşımaktadır. Bir ok VRE suşunun çoklu ilaca karşı direnç göstermesi antibiyotik duyarlılık paterninin belirleyiciliğini ortadan kaldırmaktadır. VRE'nin klonal ilişki derecesini belirlemek için çok çeşitli moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. PFGE birçok bakterinin epidemiyolojik analizi için gold standart olarak kabul edilen bir yöntemdir. *E. feacium*'un epidemiyolojik analizinde de en iyi metod olduğu bildirilmiştir (77).

Kontrol nlemleri

HICPAC tarafından hastadan hastaya VRE geçişini önlemek için alınması gereken izolasyon önlemleri şunlardır:

- VRE ile enfekte veya kolonize olan hastaların tek kişilik odalara ya da diğer VRE pozitif hastalar ile aynı odaya yerleştirilmesi.
- VRE pozitif hastaların odalarına girerken steril olmayan temiz eldiven giyilmesi.
- Hasta ile veya hasta odasındaki yüzeylerle temasın fazla olmasının beklendiği durumlarda, hastada idrar veya gaita inkontinansı olması, iloestomi, kolostomi veya açık yara direnaji varlığında VRE pozitif hastanın odasına girerken steril olmayan temiz bir önlük giyilmesi (bazı merkezlerde bu neri VRE pozitif her hastanın odasına girerken önlük giyilmesi şeklinde modifiye edilerek uygulanmaktadır).
- Eldiven ve nlğn hasta odasını terk etmeden hemen önce çıkarılması ve ellerin antiseptikli bir sabunla ya da su içermeyen antiseptik ajanlarla

yıkanması. Eldiven ve önlük çıkarılıp eller yıkandıktan sonra odadaki yüzeylerin hiçbiriyle tekrar temas edilmemesi

VRE'lerin endemik olduğu veya VRE yayılımının yukarıda belirtilen önlemlere rağmen devam ettiği hastaneler için ise şu önerilerde bulunulmuştur:

- Kontrol çalışmaları yoğun bakım ünitelerinde ve VRE yayılımının en hızlı olduğu servislerde yoğunlaştırılmalıdır. Bu servislerin diğer servislere hasta transferi nedeniyle VRE yayılımına neden olan bir kaynak konumunda olduğu akılda tutulmalıdır.
- Mümkünse VRE pozitif hasta grubuna bakım veren sağlık personelinin VRE negatif hastalara da bakım vermesinden kaçınılmalıdır.
- Nadiren sağlık personelinde VRE taşıyıcılığı ve buna bağlı VRE yayılımı bildirilmiştir. VRE nin kontrol altına alınamadığı durumlarda personel kronik cilt ve tırnak problemleri yönünden incelenmelidir. Epidemiyolojik açıdan VRE yayılımı ile ilişkili olduğu saptanan VRE taşıyıcısı personel, taşıyıcılık durumu sonlanana kadar VRE negatif hastaların bakımından uzaklaştırılmalıdır.

VRE yayılımında ortam kontaminasyonunun önemli olduğu çok sayıda çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu nedenle VRE pozitif hastaların yattıkları odalardaki yüzeylerin ve cihazların temizliğine ve dezenfeksiyonuna özel önem verilmelidir. Bu tür çalışmaların enfeksiyon kontrol ekibi tarafından yönlendirilmesi gereklidir.

2.8.2. Sürveyans Kültürleri

Bir salgın esnasında gastrointestinal kolonizasyonu tespit etmek için özel sürveyans kültürleri yapılması başarılı bir VRE kontrol programı için gereklidir (47,56). Kolonize hastaları tespit için gaita, rektal veya perirektal sürüntü taraması yapmak şeklindedir. Gaita, rektal veya perirektal sürüntü

örnekleri vankomisin içeren selektif vasatlara inoküle edilmelidir. Kolonize kişileri saptamada perirektal kültürler rektal kültürler kadar duyarlıdır (78).

Her merkez VRE kolonizasyon oranını ve fekal taşıyıcılık tarama programını belirlemelidir. Bu oran %20' nin üzerinde ise VRE fekal taşıyıcılık açısından sürekli sürveyans yapılmalı, VRE taşıyıcılık oranı düşük ya da hiç saptanmayan ünitelerde ise risk grubunu oluşturan hastalarda nokta prevalans ile VRE taramasının daha uygun olduğu bildirilmiştir (79).

Kolonizasyonun eradikasyonu

Hasta kişilerdeki enfeksiyon riskini ortadan kaldırmak, enfeksiyon kontrolündeki harcamaları minimize etmek ve çevredeki VRE rezervuarını azaltma çabaları gastrointestinal eradikasyona odaklanmıştır. Bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Oral basitrasinle tedavi edilen iki grupta umut verici sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Bir çalışmada bu tedavi ile 8 hastanın 6'sında gaitadan VRE eradikasyonunun gerçekleştiği ve bir tane rekürrens olduğu rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada basitrasin uygulaması 8 hastanın tümünde eradikasyon sağlamıştır ve 2 rekürrens görülmüştür. Başka bir çalışmada da basitrasin ve doksisisiklin tedavisi başlangıçta tüm hastalarda eradikasyon sağlanmasına rağmen uzun süreli takiplerde %33 oranında VRE kolonizasyonu olduğu bildirilmiştir. Bütün bu çalışmalar sonucunda tek başına hiçbir rejimin VRE'yi gastrointestinal traktan eradike edemediği ve bu konuda uzun süreli çalışmalar ve gözlemlere gereksinim olduğu sonucuna varılmıştır (54,80,81,82).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Etik Kurul tarafından 3.5.2006 tarihinde 2006/324 sayılı onayı sonrasında başlatıldı. Mayıs 2006 – Mayıs 2007 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan haftada bir olarak alınan dışkı, rektal veya perirektal sürüntü örneklerinde VRE varlığı araştırıldı. Ayrıca herhangi bir klinik örnekte patojen olarak saptanan enterokok suşlarında vankomisin ve/veya teikoplanin direnci saptanan izolatlar da çalışmaya dahil edildi. VRE ile kolonize olan hastalarda sürveyans kültürlerinden birden fazla VRE suşu izole edildi. Bu hastalardan ilk izole edilen suşlar çalışmaya alındı.

Sürveyans kültürlerinde VRE saptanmışsa: “Vankomisin dirençli enterokok üredi”; VRE saptanmamışsa “Vankomisin dirençli enterokok üremedi” şeklinde rapor edildi.

Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Safra eskülin azid (BEA) agar

30 gr bile eskulin agar (Oxoid) toz 1 L distile su içinde çözüldü. 121 °C’de 15’ otoklavlandı. Dökülmeden hemen önce 200 mg sodyum azid (150-250 µg/ml) ve 6 mg (6 µg/ml) vankomisin ilave edildi. 90 mm’lik steril plastik petrilere 4mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü.

Kolistin nalidiksik asit (CNA) broth

30 gr Triptik soy broth (Oxoid) toz 1 L distile su içinde çözüldü. 121 °C’de 15’otoklavlandı. Dökülmeden hemen önce 15 mg (15 µg/ml) kolistin, 15 mg (15 µg/ml) nalidiksik asit, 10 mg (10 µg/ml) gentamisin, 1 mg (1 µg/ml) amfoterisin B eklendi. 90 mm’lik steril plastik petrilere 4mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü.

Koyun kanlı agar

40gr toz besiyeri (Oxoid) 1 L distile su içinde çözüldü. 121 °C'de 15' otoklavlandı. Dökülmeden hemen önce 50 ml defibrine koyun kanı ilave edildi. 90 mm'lik steril plastik petrilere 4mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü.

Mueller Hinton agar

38 gr toz besiyeri (Becton Dickinson) 1 L distile su içinde çözüldü. 121 °C'de 15' otoklavlandı. 90 mm'lik steril plastik petrilere 4mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü.

Todd Hewitt Broth

30 gr toz besiyeri (Becton Dickinson) 1 L distile su içinde çözüldü. 121 °C'de 15' otoklavlandı. 15 ml'lik steril falkon tüplerine 3'er ml döküldü.

Brain Heart İnfüzyon Broth

37 gr toz besiyeri (Merck) 1 L distile su içinde çözüldü. 121 °C'de 15' otoklavlandı. 15 ml'lik steril falkon tüplerine 3'er ml döküldü.

3.1. Örneklerin toplanması

Steril eküvyonlar ile perirektal veya rektal sürüntü örnekleri alınarak Amies transport medium içinde mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Dışkı örnekleri temiz, sızdırmayan, kapaklı, kuru kaplar içine alındı. Örnekler laboratuvara ulaştıktan sonra yarım saat içinde mikrobiyolojik işlemlerine başlandı.

Örnek toplanması sırasında hastaların yaşı, cinsiyeti, hastaneye yatış nedeni, yatış süresi, kullandığı antibiyotikler, antibiyotik kullanma süresi ve altta yatan hastalıkları kaydedildi.

3.2. Kùltùrlerin değerlendirilmesi

Amies transport besiyerinden çıkarılan ekùvyon 350 µl steril fizyolojik serum içinde sùspanse edildikten sonra 5 – 10 “ vortekslendi. Sùspansiyonun;

- a) 50 µl’si safra eskùlin azid (BEA) agara (6 µg/ml vankomisin içeren) ekildi. Ekim yapılmış plaklar, 35 °C’de, aerop ortamda 48-72 saat inkùbe edildi. Ùreme gùnlük olarak değerlendirildi. Kahverengi-siyah koloniler (safra-eskùlin pozitif) Gram boyama metodu ile boyandı. Gram pozitif kok gùrùnùmùnde olan her bir farklı koloniden %5 koyun kanlı agara pasaj yapıldı. Ìnkùbasyon sonrası kanlı agarda ùreyen kolonilere Gram boyama, katalaz ve PYR testleri yapıldı. Vankomisin etkisinden dolayı PYR testi negatif çıkabildiğinden negatif sonuç veren kolonilerden bir pasaj daha yapıldıktan sonra PYR testi tekrarlandı.
- b) 100 µl’si kolistin nalidiksik asit (CNA) broth’a (gentamisin ve amfoterisin B içeren) ekildi. Broth, 15-18 saat aerop olarak inkùbe edildi. Bu sùre sonunda bulanıklık olmamışsa inkùbasyon 72 saate kadar uzatıldı. Ìnkùbasyon sonrası broth’dan 10 µl alınıp safra eskùlin azid (BEA) agara (6 µg/ml vankomisin içeren) pasaj yapıldı. BEA plakları 24-48 saat inkùbe edildi. BEA’da ùremiř řùpheli kolonilerden %5 koyun kanlı agara pasaj yapıldı. Ìnkùbasyon sonrası kanlı agarda ùreyen kolonilerden Gram boyama, katalaz ve PYR testi yapıldı.

Katalaz testi: Kanlı agarda ùremiř kolonilerden tahta çubuk yardımıyla alınarak temiz bir lam ùzerine sùrùldù. Ùzerine %3’lùk hidrojen peroksitten (H₂O₂) birkaç damla damlatıldı. Molekùler O₂ ùretimi sonucu hızla hava kabarcıklarının oluşması pozitif test olarak kabul edildi.

PYR testi (Oxoid): hazır olarak temin edilen PYR testi ile yapıldı. Test, ùreticinin talimatına uygun şekilde uygulandı. PYR emdirilmiş filtre kağıdı ùzerine 1-2 bakteri kolonisi koyuldu, ùzerine tampon solùsyonu damlatıldı. 5’

beklendi. Daha sonra üzerine %0.015 p-dimetylaminocinnamaldehyde içeren ayıraçtan 1-2 damla döküldü. PYR'nin hidrolizi ile oluşan beta naphthylamine ile ayırıcın reaksiyona girmesi sonucu, filtre kağıdı üzerinde pembe renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi. Pembe renk oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi.

BEA'da kahverengi-siyah koloni oluşturan gram pozitif kok görünümünde olan katalaz testi negatif, PYR testi pozitif bulunan suşlar "şüpheli VRE" olarak isimlendirildi.

3.3. Bakterilerin İdentifikasyonu

Geleneksel yöntemlerle identifiye edilen ve "şüpheli VRE" olarak tanımlanan enterokok suşları, VITEK 2 Compact otomasyon sistemi (bioMérieux) GP paneli ile tür düzeyinde tanımlandı. VITEK 2 Compact GP paneli D-amigdalın, fosfatidil inozitol fosfolipaz C, D-ksiloz, arjinin dihidrolaz, beta-galaktozidaz, alfa-glukozidaz, Ala-Phe-Pro arilamidaz, siklodekstrin, L-aspartat arilamidaz, beta galaktopiranozidaz, alfa-mannozidaz, fosfataz, lösin arilamidaz, L-prolin arilamidaz, beta glukuronidaz, alfa galaktozidaz, L-pironidonil-arilamidaz, beta glukuronidaz, alanin arilamidaz, tirozin arilamidaz, D-sorbitol, üreaz, polimiksin B direnci, D-galaktoz, D-riboz, L-laktat, laktoz, N-asetil-D-glukozamin, D-maltoz, basitrasin direnci, novobiosin direnci, %6,5 NaCl'de üreme, D-mannitol, D-mannoz, metil-B-D-glukopiranozidaz, pullulan, D-raffinoz, 0/129 direnci, salisin, sakkaroz/sükroz, D-trehaloz, arjinin dihidrolaz ve optokin direnç testlerini içermekteydi.

3.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

3.4.1. Otomatize Antibiyotik Duyarlılık Sistemi (VITEK 2 Compact)

İzole edilen tüm şüpheli VRE suşlarının VITEK 2 Compact AST (bioMérieux) paneli ile CLSI'nın enterokoklar için önerdiği penisilin, siprofloksasin, levofloksasin, norfloksasin, eritromisin, quinopristin/dalfopristin, linezolid, teikoplanin, vankomisin ve tetrasiklin duyarlılıkları belirlendi (57).

3.4.2 E- test

Tüm şüpheli VRE izolatlarına VITEK 2 Compact AST panelleriyle eş zamanlı olarak vankomisin ve teikoplanin için E-test uygulandı. E-test şeritleri (AB Biodisk) kullanım zamanına kadar -20°C'de saklandı. Kullanımdan 30' önce çıkarılıp oda sıcaklığına getirildi.

Kanlı agar besiyerine pasaj yapılmış 18 saatlik taze kültürden steril SF içinde turbidometre ile 0,5 Mc Farland standart bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. Pamuklu çubuk yardımıyla Mueller Hinton agar plağı üzerine yayıldı. 15' plağın kuruması beklendikten sonra besiyerlerine vankomisin ve teikoplanin E-test şeritleri yerleştirildi. 35 °C de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde elips şeklindeki inhibisyon alanının şeritle kesiştiği konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi.

CLSI önerilerine uygun olarak vankomisin MİK değeri ≤ 4 mg/L olan suşlar duyarlı, 8-16 mg/L olan suşlar orta derecede duyarlı, ≥ 32 mg/L olan suşlar dirençli olarak kabul edildi. Teikoplanin MİK değeri ≤ 8 mg/L olan suşlar duyarlı, 16 mg/L olan suşlar orta derecede duyarlı, ≥ 32 mg/L olan suşlar dirençli olarak kabul edildi (57).

Nitrosefin Strip Test (Oxoid)

Çubuklar kullanım zamanına kadar -20°C'de saklandı. Kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi. Çubuk saf enterokok kolonisine değdirildikten sonra bir

damla distile su ile nemlendirildi. 5' sonra değerlendirildi. Pembe-kırmızı renk değişimi beta laktamaz aktivitesi pozitif, renk değişimi olmaması negatif olarak kabul edildi. Negatif olanlar 15' sonra bir kez daha değerlendirildi. Pozitif kontrol için *S.aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı.

Suşların Saklanması

Kültür ve antibiyotik duyarlılık testleri ile VRE olduğu belirlenen suşlar triptik-soy broth içeren boncuklu ependorf tüplerine alınarak moleküler testler uygulanıncaya kadar -70 °C de saklandı.

3.5. Multiplex PCR Yöntemi ile Direnç Genotipinin Belirlenmesi:

VRE olarak saptanmış olan tüm suşlara Bell ve ark.'larının protokolü ile *van A* ve *van B* için spesifik primerler kullanılarak multiplex PCR uygulandı (84). Pozitif kontrol olarak *E. faecium* ATCC 51559 (*van A*), *E. faecalis* ATCC 700802 (*van B*) kullanıldı.

1- DNA ekstraksiyonu

Ependorf tüpleri içinde -70°C'de saklanmış olan suşlar Todd-Hewitt broth içinde bir gecelik inkübasyon ile üretildi. Bakteri süspansiyonundan 1 ml'si ependorf tüpü içinde santrifüj edildi. Pellet 200 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]) tamponu içinde süspanse edildi. Süspansiyon 95 °C'de 20' tutulduktan sonra 2' santrifüj edildi. Süpernatant kısımdan 5 µl alınarak amplifikasyon aşamasında kullanıldı.

2- Amplifikasyon aşaması

0,2ml lik PCR tüpü içine 1'er µM *van A* ve *van B*'ye özgü primerler (XXIDT), 1 U Taq DNA polimeraz (Sigma), 200 µM dNTP'ler bulunan 45µl mix ile 5 µl DNA kullanıldı. İzole ettiğimiz tüm suşlar *E. faecium* olduğu için *van C*'ye özgü primerler kullanılmadı. 1' 94°C'de denatürasyon, 2' 60°C'de annealing ve

2' 72°C'de zincir uzama şeklinde 35 PCR siklusu uygulanarak amplifikasyon gerçekleştirildi. Amplifiye ürün +4°C'de saklandı.

Primerlerin baz dizilimi:

VanAB Forward :GTAGGCTGCGATATTCAAAGC

VanA Reverse :CGATTCAATTGCGTAGTCCAA

VanB Reverse :GCCGACAATCAAATCATCCTC

3-Elektroforez aşaması

Amplifiye ürünlere %2'lik agaroz jelde elektroforez uygulandı. Jel 15' etidium bromide ile boyandı. 15' yıkandı. UV altında değerlendirildi. Van A için 231bp, Van B için 330bp'lik bantların varlığı araştırıldı (84).

3.6. PFGE ile Klonal İlişkinin Belirlenmesi

10 VRE suşuna Murray ve ark.'larının (114) protokollerinden modifiye ederek oluşturulan protokol kullanarak PFGE uygulandı.

3.6.1. Kimyasal Solüsyonların ve Tamponların Hazırlanması

Tris 1M PH PH:7,4: 12,114 gr Trisma base toz (Sigma) 100ml distile su içinde çözüldü. PHmetre ile PH ayarlaması yapıldı. Kullanım zamanına kadar oda ısısında bekletildi.

Tris 1M PH PH:8: 12,114 gr Trisma base toz (Sigma) 100ml distile su içinde çözüldü. PHmetre ile PH ayarlaması yapıldı. Kullanım zamanına kadar oda ısısında bekletildi.

EDTA 0,5 M PH:7,5: 37,224 gr EDTA toz (Sigma) 100ml distile su içinde çözüldü. PHmetre ile PH ayarlaması yapıldı. Kullanım zamanına kadar oda ısısında bekletildi.

EDTA 0,5 M PH:8: 37,224 gr EDTA toz (Sigma) 100ml distile su içinde çözüldü. PHmetre ile PH ayarlaması yapıldı. Kullanım zamanına kadar oda ısısında bekletildi.

NaCl 5M:29,22 gr NaCl toz (Reidel-de Hein) 100 ml distile su içinde çözümlenerek hazırlandı. Kullanım zamanına kadar oda ısısında bekletildi.

KCl 0,4M:2,982 gr KCl toz (Reidel-de Hein) 100ml distile su içinde çözümlenerek hazırlandı. Kullanım zamanına kadar oda ısısında bekletildi.

Sodyum deoksikolat %2 lik: 2 gr sodyum deoksikolat toz (Fluka) 100ml distile su içinde çözümlenerek hazırlandı. Kullanım zamanına kadar oda ısısında bekletildi.

Sarkozin %5'lik: 10 gr sarkozin toz (Fluka) 100ml distile su içinde çözüldü. Kullanım zamanına kadar oda ısısında bekletildi.

Brij 58 %10'luk: 10 gr brij 58 toz (Sigma) 100ml distile su içinde hafifçe ısıtılarak çözüldü.

SDS %10'luk: 10 gr sodyum dodesil sülfat toz (Fluka) 100ml distile su içinde hafifçe ısıtılarak çözüldü. Kullanım zamanına kadar oda ısısında bekletildi.

Proteinaz K 20mg/ml: 20 mg Proteinaz K toz (Sigma) 1ml distile su içinde çözümlenerek hazırlandı. Kullanım zamanına kadar -20⁰C'de bekletildi.

Lizozim 10mg/ml: 10 mg Lizozim toz (Fluka) 1ml distile su içinde çözümlenerek hazırlandı. Kullanım zamanına kadar -20⁰C'de bekletildi.

Ribonükleaz A 1mg/ml: 1 mg Ribonükleaz A toz (Fluka) 1ml distile su içinde çözümlenerek hazırlandı. Kullanım zamanına kadar -20⁰C'de bekletildi.

Low melting agaroz (LMA) %2,4'lük : 0,24 gr LMA (NuSieve GTG Agarose) 10 ml distile su içinde eritildi.1,5 ml'lik ependorf tüplerine dağıtıldı.Kullanılincaya kadar oda ısısında bekletildi.

10X TBE (Tris+Borik asit+EDTA): 108gr Tris (Sigma) ve 55 gr borik asit (Carlo Erba) 980 ml distile su içinde çözüldü. 20 ml EDTA [0,5M (PH:8)] eklendi.

PIV: 0,01M Tris+1M NaCl ile hazırlanarak membran filtre ile süzöldü.

EC lizis solüsyonu :0,006M Tris:1M+NaCl+0,1M EDTA+%5 Brij58+%0,2 sodyum deoksikolat+%0,5 sarkozin+2mg/ml lizozim+100 µg/ml RNAse ile hazırlandı.

ESP solüsyonu:100mM KCl+40mM Tris+5mM MgCl₂+%1SDS+500 µg/ml Proteinaz K ile hazırlandı.

Sma I tamponu: 0,006M Tris+0,02M KCl+0,006M MgCl ile hazırlandı

3.6.2. PFGE İşlemi

Birinci Gün

-70 °C'de Triptik Soy broth içeren boncuklu ependorf tüplerine saklanmış olan suşlar Mueller Hinton agarda 37 °C'de bir gecelik inkübasyonla üretildi.

İkinci Gün

Birkaç enterokok kolonisi alınıp BHI (Brain-Heart infüzyon) broth'a ekim yapıldı. 37 °C' de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edildi.

Üçüncü Gün

İnkübasyon sonunda her bakteri süspansiyonununun 1 ml'si alınarak 1,5ml'lik steril ependorf tüpleri içinde 6000 rpm de 30" santrifüj edildi. Pellet 1 ml PIV ile yıkandı

Yıkama sonrası oluşan pellet 0,4 ml PIV ile süspansiyon edildi. Spektrofotometre kuvvetlerine 960 µl PIV ve 40 µl bakteri süspansiyonu eklenerek 620 nm dalga boyunda optik dansitesi ölçüldü. Ölçülen optik dansite değerine göre hesap edilen miktarda PIV her bir süspansiyona eklenerek süspansiyonlar standart hale getirildi.

Eklenecek PIV miktarı=Ölçülen optik dansite değeriX50X210-210

Elde edilen standart bakteri süspansiyonu ve %2,4'lük LMA ile 50 °C'deki su banyosu içinde tutularak jelin çözülmesi ve süspansiyonun 50°C'ye gelmesi sağlandı. Bakteri süspansiyonunun 0,15 ml'si eşit miktardaki %2,4'lük LMA ile karıştırılarak kalıplara döküldü. 20' +4°C'de donması beklendi. Donduktan sonra pluglar kalıptan çıkarılarak 1ml EC lizis solüsyonu içeren ependorf tüpleri içine alındı. EC lizis solüsyonu içinde pluglar 37°C de bir gece inkübe edildi.

Dördüncü Gün

İnkübasyon sonunda EC lizis solüsyonu aspire edilerek yerine 1ml ESP solüsyonu eklendi ve 50 °C de bir gece inkübasyona bırakıldı.

Beşinci Gün

İnkübasyon sonunda ESP tamponu alınıp 1ml 1xTE tamponu ile 6 kez 30' 4 °C'de yıkama yapıldı.

Yıkama sonunda DNA plugları 400 µl Smal enzim tamponunda oda ısısında 30' inkübe edildi.

Süre sonunda tampon boşaltılıp yerine 20 IU Smal enzimi içeren 200 µl 1xSmal tamponu konularak 30°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pluglar 4°C'de bir kez 30 ml TE buffer ile yıkandı.

Jelin hazırlanması: 5ml 10X TBE 95 ml distile su ilave edilerek 100 ml 0,5X TBE hazırlandı. 100 ml 0,5X TBE ile 1 gr agaroz (Seakem Gold Agarose) karıştırılıp eritildi. Kalıba döküldü. 1 saat jelin donması için oda ısısında bekletildi.

Jel donduktan sonra pluglar jele yüklendi. 1., 7. ve 13. kuyucuklara λ büyüklük belirteci (Sigma) konuldu. Chef Dr III (Bio-rad) sistemi kullanılarak başlangıç değişim zamanı 5,3", final değişim zamanı 34,9" olacak şekilde 14 °C'de 20 saat 6V/cm elektroforez uygulandı.

Altıncı Gün

Elektroforez sonunda jel 0,5 µg/ml etidium bromide içeren 250ml 0,5xTBE ile +4 °C'de 30' boyandı ve 30' +4 °C'de distile su ile yıkandı. Jel UV altında değerlendirildi ve fotoğraflandı.

Yorumlama

GelCompar II yazılım sistemi (Version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) kullanılarak PFGE profillerinin, denrogramı oluşturuldu ve kümeleşme analizleri yapıldı.

Yorumlama Tenover (85) kriterlerine göre yapıldı. Bu kriterlere göre;

Aynı izolatlar: Aynı sayı ve boyutlarda bant içeren izolatlardır. Bu izolatlar, genetik olarak farksız kabul edilir. Epidemiyolojik olarak ilişkilidir.

Yakın ilişkili izolatlar: Salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı vardır. Büyük bir olasılıkla salgınla ilişkili suşlardır.

Muhtemel ilişkili izolatlar: Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı vardır. Muhtemelen salgınla ilişkilidirler.

İlişkisiz izolatlar: Aralarında ≥ 7 bant farkı olan suşlardır. Salgınla ilişkileri bulunmayan suşlardır.

4.BULGULAR

Mayıs 2006 – Mayıs 2007 tarihleri arasında ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına aerob kültür istemiyle gönderilen yaklaşık 35000 klinik örnekten üreme saptanan 5309 tanesinin 529'unda (%1,5) enterokok izole edildi. 529 izolatin 3'ü (%0,5) vankomisine dirençliydi. Ayrıca haftada bir kez başta yoğun bakım üniteleri olmak üzere çeşitli kliniklerde yatan hastalardan alınan 1200 sürveyans kültürünün (rektal sürüntü, dışkı veya perianal sürüntü) 58'inde (%4,8) VRE saptandı. Vankomisine dirençli bulunan suşların hepsi *E. faecium* olarak identifiye edildi.

İzole edilen ilk VRE (izolat 1) pediatri yoğun bakım ünitesinde yatan bir hastanın yara yeri sürüntüsünde üredi. Daha sonra aynı hastanın kulak (izolat 2), idrar (izolat 3) ve dışkı (izolat 4) kültürlerinde de VRE üremesi saptandı. 5 no'lu izolat aynı dönemde pediatri yoğun bakım ünitesinde yatan bir hastanın kan kültüründe üredi. 6,7 ve 8 no'lu izolatlar yine aynı dönemde pediatri servisinde yatan farklı hastaların rektal sürüntü kültürlerinden izole edildi. 9 ve 10 no'lu izolatlar aynı tarihlerde Beyin Cerrahisi Yoğun Bakım ve hematoloji ünitesinde yatan iki hastanın sürveyans kültürlerinden izole edildi. Bu hastalara ait demografik veriler tablo 4.1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo4.1.VRE izole edilen hastalara ait demografik veriler

Izolasyon No	Hasta No	Örnek	Hastanın yattığı klinik	Yaş/Cinsiyet	Altta yatan hastalık	Son üç ay içinde kullandığı antibiyotikler	Uygulanan İnvaziv girişimler ve diğer risk faktörleri	Hastanın sonraki izlemleri
1	1	Yara yeri	Pediatri YBÜ	2 yaş/♂	HLH (Hemofagositik lenfositosis)	Amikasin, Seflazidim, Vankomisin, Teikoplanin, Meropenem, Metronidazol, Amp B	Santral venöz kateter Febril nötropeni TPN Üriner kateter	VRE pozitifliği devam etti 3 ay sonra exitus
2	1	Kulak						
3	1	Rektal sürüntü						
4	1	İdrar						
5	2	Kan	Pediatri YBÜ	3 yaş/♂	Kardiyopulmoner arrest ilaç intoksikasyonu?	Teikoplanin, flukonazol, Meropenem, Seftriakson, Lipozomal, Amp B	Orotrakeal entübasyon NG sonda Üriner kateter TPN	Yatışının 25. gününde exitus
6	3	Rektal sürüntü	Pediatri YBÜ	6 yaş/♂	Down sendromu+ALL(Akut lenfoblastik lösemi)	Seflazidim, Amikasin, Amp B, Teikoplanin, Sefepim	Santral kateter NG sonda Üriner kateter Febril nötropeni, TPN	8 haftadır VRE pozitifliği devam ediyor
7	4	Rektal sürüntü	Pediatri YBÜ	19 ay/♀	Spinal muskuler atrofi+Akciğer enfeksiyonu	Vankomisin, Amikasin, Sefaperazon/sulbaktam, Piperasilin/tazobaktam, Amp B	Trakeostomi Gastrostomi Cut-down NG sonda Üriner kateter, TPN	VRE pozitifliği devam etti 5 hafta sonra exitus
8	5	Rektal sürüntü	Pediatri YBÜ	10 yaş/♂	Serebral palsi+Akciğer enfeksiyonu	Seftriakson, teikoplanin amikasin, meropenem, Amp B, sefaperazon sulbaktam, imipenem, siprofloksasin vankomisin, flukonazol	Trakeostomi Gastrostomi Üriner kateter TPN	10 haftadır VRE pozitifliği devam ediyor
9	6	Rektal sürüntü	Beyin cerrahi YBÜ	76 yaş/♀	Intraserebral hematom	Metranidazol, Sefazolin	Beyin cerrahi operasyonu Trakeostomi Üriner kateter TPN	VRE pozitifliği devam etti Yatışının 18. gününde exitus
10	7	Rektal sürüntü	Hematoloji servisi	56 yaş/♀	AML (Akut myeloblastik lösemi)	Piperasilin/tazobaktam, Amikasin, Amp B, Itrakonazol, Trimetoprim-sülfometoksazol	Kemoterapi	8 haftadır VRE pozitifliği devam ediyor

10 VRE izolatının antibiyotik duyarlılıkları VITEK 2 Compact AST paneli ile belirlendi. İzolatların tamamı penisilin, eritromisin, teikoplanin ve vankomisine dirençli, 1 suş (izolat 10) dışında siprofloksasin, levofloksasin ve norfloksasine direnç saptanmadı. Suşların hiçbirinde beta laktamaz aktivitesine rastlanmadı. Suşların hiçbirinde quinopristin/dalfopristin ve linezolid direnci saptanmadı. Tüm suşlarda yüksek düzeyde aminoglikozid direnci mevcuttu (tablo 4.2).

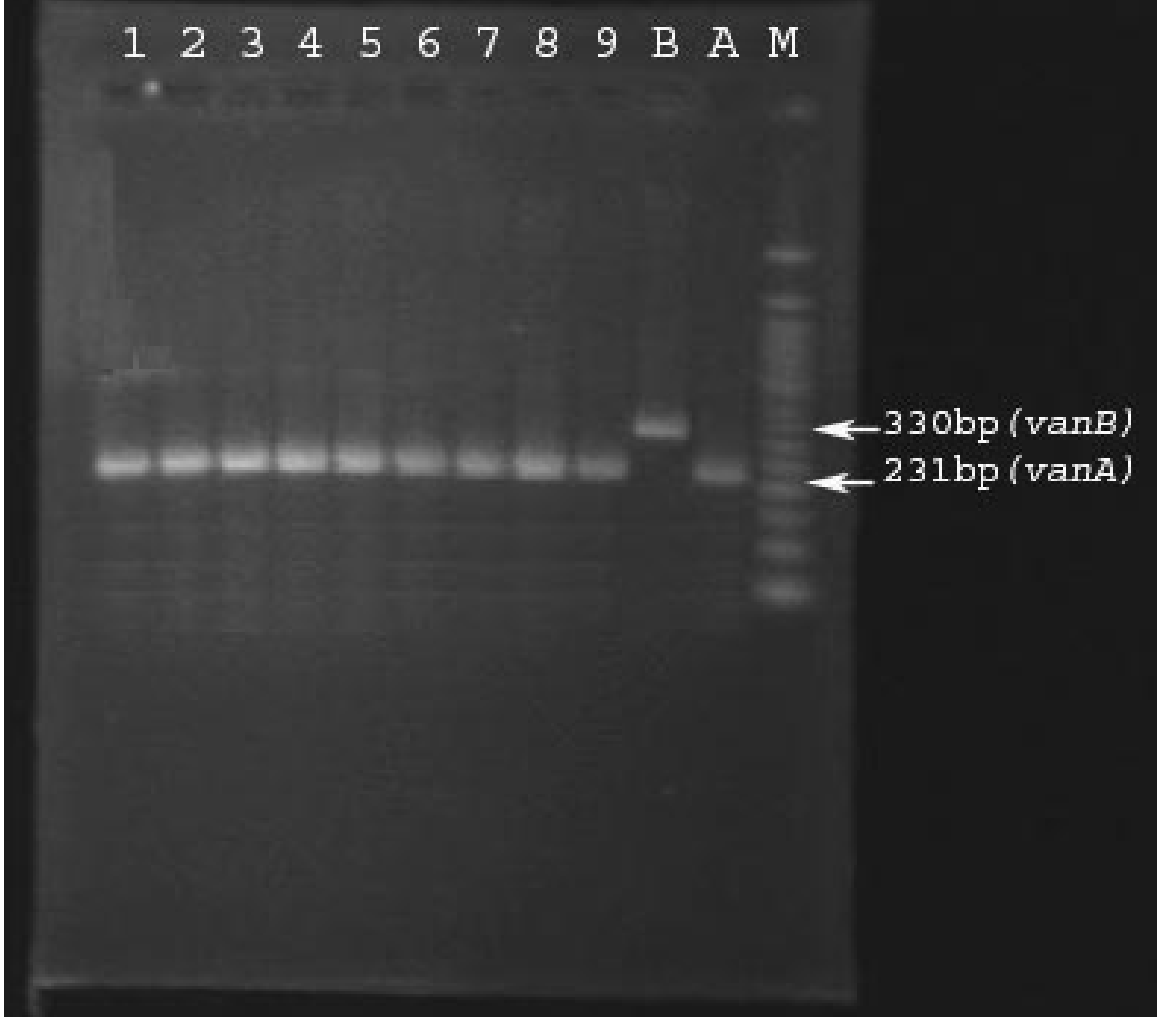
Tablo 4.2. VRE suşlarının antibiyotik duyarlılıkları

	İzolat No									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Penisilin	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di
Siprofloksasin	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Di
Levofloksasin	O	O	O	O	O	O	O	O	O	Di
Norfloksasin	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Di
Eritromisin	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di
Quinopristin/Dalfopristin	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
Linezolid	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
Teikoplanin	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di
Vankomisin	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di
Tetrasiklin	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
YDGD	Neg	Neg	Neg	Poz	Neg	Poz	Poz	Neg	Neg	Poz
YDSD	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Poz	Neg
Beta laktamaz	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

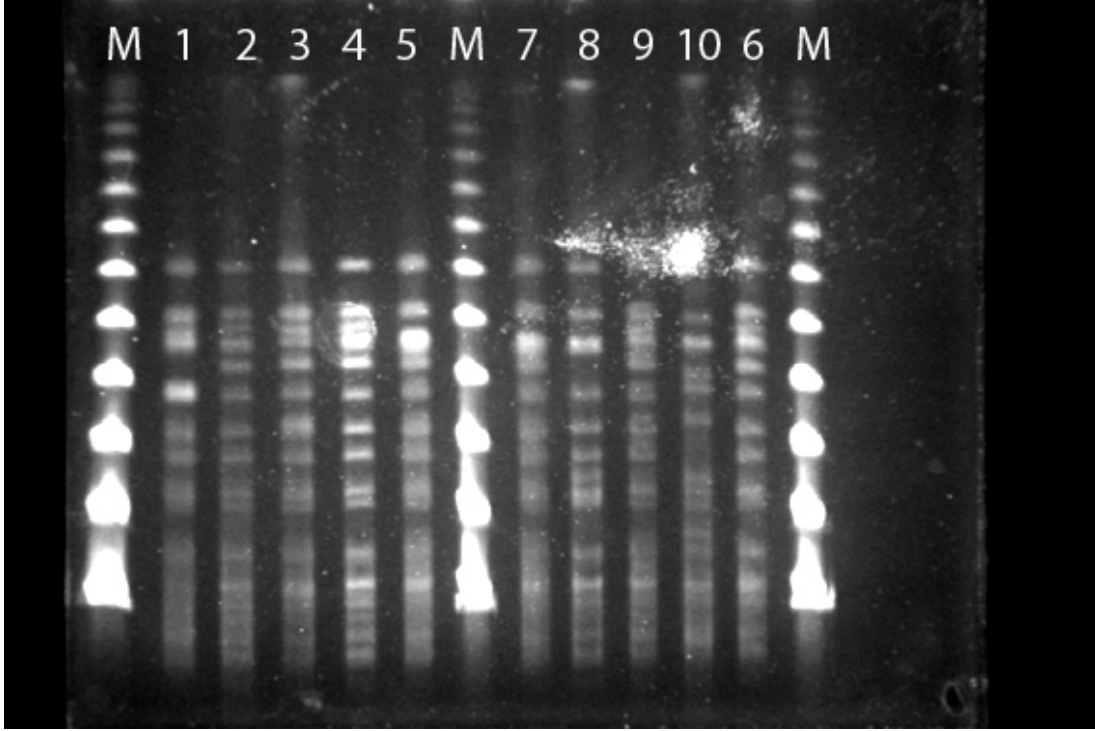
Di:Dirençli, Du:Duyarlı, O:Orta, Neg:Negatif, Poz:Pozitif, Neg: Negatif,YDGD:Yüksek düzeyde gentamisin direnci, YDSD: Yüksek düzeyde streptomisin direnci

10 izolatın VITEK 2Compact AST paneli ile belirlenen MİK değerleri tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Multiplex PCR ile tüm izolatların 231bp büyüklüğünde bant oluşturduğu gözlemlendi. Tüm suşların *van A* genotipine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.1).

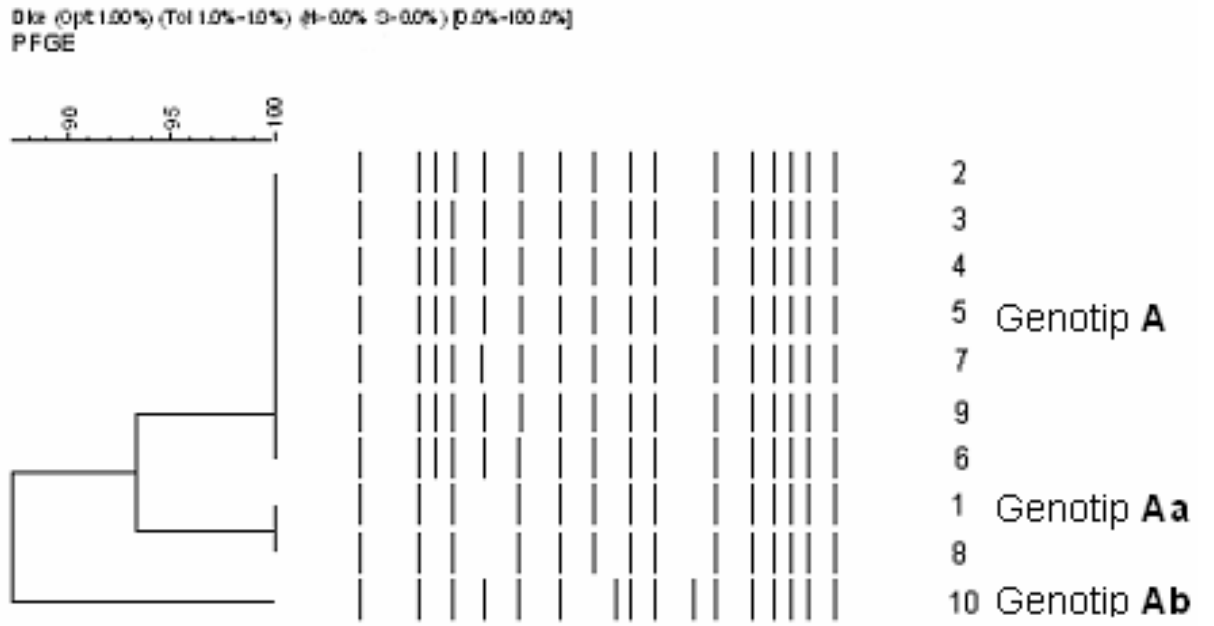


Şekil 4.1.VRE izolatlarının multiplex PCR ile direnç tipinin gösterilmesi. M: marker, A:*van A* pozitif kontrol *E. faecium* ATCC 51559, B:*van B* pozitif *E. faecalis* ATCC 700802



Şekil 4.2. VRE suşlarının PFGE ile klonal ilişkilerinin gösterilmesi. M: λ büyüklük belirteci

PFGE ile 10 VRE izolatu klonal ilişkileri açısından değerlendirildi (Şekil 4.2). Tüm izolatlar klonal olarak ilişkili bulundu (Şekil 4.3)



Şekil 4.3.PFGE ile oluşturulan restriksiyon paternlerinin dendogramı

Bu dendogramda Tenover ve ark. tarafından geliştirilmiş kriterlere göre; genotip A, Aa ve Ab olmak üzere 3 genotip belirlendi.

Genotip A: 2,3,4,5,6,7 ve 9 nolu izolatlar identik olarak bulundu.

Genotip Aa: 1 ve 8 nolu suşlar Genotip A suşlarından 2 bant farklılık göstermekteydi ve Genotip A suşlarıyla yakın ilişkili olarak değerlendirildiler.

Genotip Ab: 10 nolu izolatın Genotip A'dan 4 bant farklılığı olduğu saptandı. Genotip A ile muhtemel ilişkili izolat olarak değerlendirildi.

5.TARTIŞMA

Son yıllarda enterokokların etken olduğu hastane enfeksiyonlarında belirgin bir artış gözlenmektedir. Bu artışın enterokokların intrensek olarak dirençli oldukları üçüncü kuşak sefalosporinlerin yaygın olarak kullanılmaya başlanmasıyla ilişkili olduğu düşünülmekle beraber; invaziv girişimlerin daha sık kullanılması, uzun süreli hastanede ve özellikle yoğun bakım ünitesinde yatış ve immün düşkün konakçıların artmasının da bu tabloya katkıda bulunan diğer faktörler olduğu bilinmektedir. Enterokoklar nozokomiyal bakteremilerin üçüncü, üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının ikinci sıklıkta saptanan etkenidirler ve tüm nozokomiyal enfeksiyonların %10'undan sorumludurlar. Çeşitli nedenlerle immün sistemin baskılanması, hastanede yatış süresinin uzaması, hematolojik maligniteli hastalarda uzun süreli tedavi uygulamaları, intravasküler kateter veya protezler enterokok enfeksiyonu riskini arttırmaktadır. Enterokokların pek çok antibiyotiğe intrensek olarak dirençli olmaları ve penisilin ile aminoglikozidlere karşı artan oranda direnç göstermeleri, ayrıca kullanımda olan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilme yetenekleri, bu bakterilere bağlı enfeksiyonların tedavisinde önemli problemler yaratmaktadır. Enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde son seçenek olarak görülen glikopeptidlere dirençli kökenlerin ortaya çıkması ise sorunu daha da önemli hale getirmiştir.

İlk VRE suşları 1988'de İngiltere'den ve hemen ardından da Fransa'dan bildirilmiştir (31,91). Avrupa'da VRE'nin rezervuarı hayvan çiftlikleridir. Avrupa'da hayvan yemlerine ilave edilen bir glikopeptit olan avoparsin vankomisine direnç gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. ABD'de ise daha sonra (1989) saptanmasına rağmen, çok hızlı bir yayılım göstermiştir. Amerika'da avoparsin kullanımı söz konusu değildir. VRE ile yüksek kolonizasyon ve enfeksiyon oranlarına antibiyotiklerin fazla kullanımının neden olduğu düşünülmektedir. 1997' de CDC, yoğun bakım ünitelerindeki hastaların %23,3' ünün, yoğun bakım ünitesi dışındaki hastaların ise %15,5' inin VRE ile kolonize olduğunu bildirmiştir (86). 1998'de 100'den fazla mikrobiyoloji laboratuvarını kapsayan bir çalışmada enterokok izolatlarının %52'sinin vankomisine dirençli olduğu bildirilmiştir (87).

San Francisco’da yapılan bir çalışmada da bu bölgedeki 33 hastaneden 1993’de % 3’ü VRE’li olgu bildirmişken, bu oran 1998’de % 100’e çıkmıştır (88). İngiltere’de yapılan bir çalışmada VRE oranı hastanede yatan böbrek hastalarında % 15, diğer hastalarda % 5 ve ayaktan tedavi gören hastalarda % 2 olarak bulunmuştur (89). 1992 yılında Belçika’da yapılan bir çalışmada ise toplumda sağlıklı gönüllülerde % 28 VRE kolonizasyonu saptanmıştır (90).

Ülkemizde ilk VRE suşu 1998’de Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Pediatrik Hematoloji Servisinde yatan bir malign histiositoz olgusuna ait plevral sıvıdan izole edilmiştir (11). Bu olgudan sonra, çeşitli merkezlerden enfeksiyon ve kolonizasyon bilgileri ortaya çıkmıştır. Öngen ve ark. (92) kateter; Gündeş ve ark. (112) ve Celkan ve ark. (93) kan kültüründen; Kılıç ve ark. (102) üçü kan biri de BOS kültüründen olmak üzere 4 VRE izole etmişlerdir. Ertek ve ark. (94) hastanede yatan 100 hastanın 68’inden enterokok izole etmiş, bunların da 13’ünün (%19.1) vankomisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ceryan ve ark. (95) rektal sürüntü kültüründen elde edilen 197 enterokok suşundan 5’inde (%2.5) VRE saptamışlardır. Ağuş ve ark. yatan hastalardan gönderilen klinik örneklerden 64 enterokok izole etmişler ve bunların üçünün VRE olduğunu bildirmişlerdir (96). Gazi ve ark. (97) hastane enfeksiyonu etkeni olan 123 enterokok suşunda vankomisin direncini araştırmışlar ve 1 suşun VRE olduğunu bildirmişlerdir. 2002 yılında hastanemizde hematolojik malignensili hastalarda yapılan sürveyans çalışmasında 150 hastanın ikisinin rektal sürüntü kültüründen VRE izole edilmiş ancak hastalarda VRE enfeksiyonu gelişmediği bildirilmiştir (111). Bizim çalışmamızda enterokok üreyen 529 izolatin 3’ünde (%0,5); 1200 sürveyans kültürünün (rektal sürüntü, dışkı veya perianal sürüntü) 58’inde (%4.8) VRE saptandı. 260 yoğun bakım ünitesi hastasının yedisinde (%2) VRE izole edildi.

Yapılan çalışmalarda, dirençli enterokok kolonizasyonunun erken tespitinde rektal sürüntü kültürlerinin yapılması en uygun yöntem olarak bildirilmiştir (47,69,99). Gaita kültürü için kullanılan klasik besiyerlerinde baskın gram-negatif gaita flora bakterilerinin varlığı VRE izolasyonunu

zorlaştırmaktadır. Çoğu zaman büyük mukoid gram-negatif bakteri kolonileri enterokok kolonilerinin üzerini kapatarak özellikle az miktarlarda VRE bulunması durumunda kolaylıkla gözden kaçabilmektedir. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için gaitadan VRE izolasyonu için seçici besiyerleri kullanılmaktadır. VRE taşıyıcılığının saptanmasında farklı çalışmalarda farklı besiyerleri kullanılmıştır. Landman ve ark. VRE fekal taşıyıcılığını tanımlamada 5 selektif besiyerini ve farklı metodları karşılaştırmışlar ve enterokokosel broth'un VRE tespiti açısından en duyarlı besiyeri olduğunu bildirmişlerdir (69). Gambarotto ve ark. (70) ise, hematoloji yoğun bakım ünitesinde yaptıkları çalışmada 4 mg/L vankomisin içeren zenginleştirilmiş "bile eskulin broth" ve 6 mg/L vankomisin içeren agar kullanmış, ve VRE pozitif suşların %75' inin broth' ta ürerken, agar besiyerlerinde üremediğini saptamıştır. Ieven ve ark. 213 gaita ve 122 rektal sürüntü örneğinde hem enterokokosel agar hem de zenginleştirici enterokokosel broth kullanmışlar ve sadece agar kullanımı ile %46,5 oranında VRE izolatlarını saptanamadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda VRE izolasyonunda hem 6 µg/ml vankomisin içeren BEA agar hem de zenginleştirici CNA broth kullanılmıştır. İzole edilen tüm suşlar hem agarda hem de brothda saptanmıştır. Ayrıca zenginleştirici broth kullanılması ile direkt agara ekim yapılması arasında duyarlılık açısından bir fark bulunamamıştır.

Çalışmamız süresince dördü klinik örnek altısı rektal sürüntü kültüründen olmak üzere 7 hastadan 10 VRE suşu izole edilmiştir.

İzole ettiğimiz ilk VRE suşu yaklaşık 1,5 yıl önce hemofagositik lenfositik histiositoz (HLH) tanısı almış olan 2 yaşındaki bir çocuk hastaya ait dekübit ülseri sürüntü örneğinden üretildi. Daha sonra aynı hastaya ait kulak sürüntüsü, rektal sürüntü ve idrar kültürlerinden de VRE izole edildi. Bu hasta zaman zaman taburcu edildiği birkaç günlük aralar dışında 1,5 yıldır Pediatri YBÜ'nde tedavi gören, febril nötropenik olması nedeniyle de çok uzun zamandır geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan bir hastaydı. Hasta aralıksız 80 gündür vankomisin tedavisi almaktaydı. VRE kolonizasyonunun tespitinden sonra

haftalık yapılan sürveyans kültürlerinde VRE pozitifliği devam etti ve hasta ilk VRE tespitinden 3 ay kadar sonra kaybedildi.

İkinci hasta kardiyopulmoner arrest tablosuyla acil servise getirilen ve pediatri YB'ne yatırılan entübe, mekanik ventilasyon uygulanan geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan 3 yaşında bir çocuktu. Yatışının 25. gününde alınan kan kültüründe VRE üremesi tespit edildi. Hastanın o güne kadar yapılan sürveyans kültürlerinde VRE saptanmamıştı. Kan kültüründe VRE izole edildiğinde hasta ölmüştü.

nc hasta yine aynı dönemde pediatri YBÜ'de yatan akut lenfoblastik lösemi (ALL) tanılı 6 yaşında erkek hastaydı. Bu hastanın rektal sürüntü kültüründe VRE saptandı. Ancak hastada VRE ile bir enfeksiyon gelişmedi. Bu hasta da febril nötropeni nedeniyle geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan santral venöz kateteri olan bir hastaydı. Bu alışma yazıldığında 8 haftadır VRE pozitifliği devam etmekteydi.

Dördüncü hasta 7 aylıkken spinal muskuler atrofi tanısı almış ve yaklaşık 1 yıldır birkaç defa kısa dönemler taburcu edilmesinin dışında pediatri YBÜ'de yatan akciğer enfeksiyonu nedeniyle geniş spektrumlu antibiyotik alan trakeostomili mekanik ventilasyon uygulanan gastrostomili bir hastaydı. 5 hafta boyunca VRE pozitifliği sürdü. 5. haftanın sonunda hasta kaybedildi.

Serebral palsy tanılı akciğer enfeksiyonu nedeniyle 5 aydır YBÜ'de yatan ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanmakta olan, trakeostomili mekanik ventilatör uygulanan, gastrostomisi olan 5 nolu hasta 10 yaşında bir erkekti. 10 haftadır sürveyans kültürlerinde VRE pozitifliği devam etmekteydi.

Altıncı hastamız İnteraserebral hematoma teşhisiyle acil opere edilmiş ve Beyin cerrahi YB'ne yatırılan 76 yaşında kadın hastaydı. Ameliyatın 13. gününde alınan rektal sürüntü kültüründen VRE izole edildi. Hastanın bilinci kapalı ve genel durumu kötüydü. 13 gündür geniş spektrumlu antibiyotik alıyordu. Trakeostomisi vardı ve mekanik ventilasyon uygulanıyordu. Yatışının 18. gününde kaybedildi.

AML tanısıyla almış kemoterapi uygulanmış, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi almış ve KHN (kök hücre nakli) yapılmak için bekleyen 56 yaşındaki kadın hasta da sürveyans kültüründen VRE izole ettiğimiz yedinci olguydu. 8 haftadır VRE pozitifliği sürmekteydi.

Klinik örneklerinde veya sürveyans kültürlerinde VRE saptadığımız yedi hastanın dört tanesi çalışma süremiz içinde kaybedildi. Bunlardan sadece birinde (2 nolu hasta) VRE bakteremisi saptandı. Diğer üç hastada (1,7 ve 9 nolu hastalar) ölüm sebebi VRE enfeksiyonu değildi. Şu anda hala kolonizasyonu devam eden üç hastada (6,8 ve 10 nolu hastalar) ise bu süre içinde VRE enfeksiyonu gelişmedi.

VRE için en önemli rezervuar gastrointestinal sistemdir (98). Kolonizasyon enfeksiyondan önce olabilir ve aylarca sürebilir. Vankomisin direnci özellikle hastanede yatan hastalarda önemli bir problemdir. VRE ile kolonize hastalar nozokomiyal epidemilere kaynak oluşturabilir. Bizim çalışmamızda da 1 nolu hastanın hastanemizde ortaya çıkan VRE enfeksiyonlarına ve kolonizasyonuna kaynak oluşturduğu söylenebilir. VRE kolonizasyonunun erken tespiti yayılımı engellemek ve kolonize hastalardaki enfeksiyonu önlemede en önemli basamağı oluşturmaktadır.

Klinik örneklerden veya sürveyans kültürlerinden VRE tespit edilen hastalar hemen hastane enfeksiyonları kontrol komitesine (HİKK) bildirildi. HİKK tarafından VRE pozitifliği saptanan tüm hastalara tek kişilik odalara alınarak bu odaların giriş çıkışı kontrol altına alındı. Bu hastaların odalarına girerken eldiven, maske ve tek kullanımlık önlük giyilmesi ve hasta odasını terk etmeden hemen önce çıkarılması, ellerin sabunla ya da su içermeyen antiseptik ajanlarla yıkanması, eldiven ve önlük çıkarılıp eller yıkandıktan sonra odadaki yüzeylerin hiçbirisiyle tekrar temas edilmemesi sağlandı.

VRE kolonizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda risk faktörlerinin hastaya ait faktörler, hastaneye ait faktörler ve başta vankomisin olmak üzere antimikrobiyal ajan kullanımı olduğu bildirilmiştir (63-67). Hastaya ait faktörler

yapılan birçok çalışmanın sonucuna göre kronik böbrek yetmezliği, malignite, nötropeni, diabetes mellitus, geçirilmiş intraabdominal cerrahi, organ transplantasyonu, APACHE II skorunun yüksek olması, *C. difficile*'e bağlı kolit, hepatobiliyer hastalık gibi hastanın altta yatan hastalığının ağırlığı ile ilgili faktörlerdir. Bizim çalışmamızda da VRE saptanan tüm hastalarda hastaya ait risk faktörleri mevcuttu. 3 hasta (1, 3 ve 7 nolu hastalar) immun düşküdü. Bunlardan ikisi (3 ve 7 nolu hastalar) malignite nedeniyle kemoterapi almış hastalardı. İkisi (1 ve 3 nolu hastalar) febril nötropenik hasta idi. Bir hasta (9 nolu hasta) beyin cerrahi operasyonu geçirmişti. Bir hasta (3 nolu hasta) kardiyopulmoner arrest tablosunda hastaneye getirilmiş olup bilinci kapalı ve genel durumu kötüydü. İki hasta (4 ve 5 nolu hastalar) ise ilerleyici kas hastalığı yüzünden genel durumları kötü olan hastalardı.

Hastaneye ait risk faktörleri ise özellikle yoğun bakım, diyaliz, transplantasyon, hematoloji - onkoloji üniteleri başta olmak üzere hastanede yatış süresinin uzun olması, VRE ile kontamine tıbbi alet ve cihazlara maruziyet ve VRE'li hastalarla temastır. Bizim VRE saptadığımız hastaların hastanede yatış süreleri 13 gün-1,5 yıl arasında değişiyordu. Bir hasta dışında tümünde yoğun bakım ünitesinde yatış öyküsü vardı. Bir hasta ise hematoloji ünitesinde yatıyordu. Üç hastaya mekanik ventilatör uygulanıyordu. İki hasta gastrostomi operasyonu bir hasta da beyin cerrahi operasyonu geçirmişti. Tüm hastalarda santral venöz kateter veya cut-down açılmıştı. Bir hasta (10 nolu hasta) dışında tümünde TPN ile beslenme öyküsü mevcuttu.

Daha önceden vankomisin, 2.-3. kuşak sefalosporinler, metronidazol, klindamisin, imipenem, tikarsilin-klavulonik asit gibi antimikrobialleri kullanma ve kullanma süresinin de önemli risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Fridkin ve ark. (100) yoğun bakım ünitesinde yaptıkları bir çalışmada, 3. kuşak sefalosporin ve vankomisin kullanımının, diğer faktörlerden bağımsız olarak VRE insidansında artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Kolar ve ark. (101) yaptıkları çalışmada, % 15.1 olan VRE oranının, glikopeptid ve üçüncü kuşak sefalosporin kullanımının kısıtlanmasıyla, %6.1'e düştüğünü belirtmişlerdir. VRE izole

ettiğimiz tüm hastalarda da uzun süreli ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanım öyküsü mevcuttu. İki hasta dışında tüm hastalarda uzun süreli glikopeptid kullanımı, bir hasta dışında tümünde antifungal ve üçüncü kuşak sefalosporin kullanımı mevcuttu.

Enterokoklar penisilin ve sefalosporinlere intrinsek olarak dirençlidir.

E.faecalis izolatları için penisilin MİK değerleri diğer streptokokların MİK değerlerinden 100 kat daha yüksek olup 2-8 mg/L arasındadır. *E.faecium* ise daha da dirençli olup penisilin MİK değeri 16-32 mg/L'dir. Çeşitli klinik materyallerden izole edilen enterokok suşlarında penisilin direncini Ağuş ve ark. (97) %84; Gazi ve ark. % 46 olarak bildirmişlerdir. Kılıç ve ark. (102) ise 25 VRE suşunun tamamının penisiline dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bizim suşlarımızın da tamamı penisiline yüksek düzeyde dirençli bulunmuştur (MİK \geq 64 mg/L).

Enterokoklarda beta laktamaz üretimine bağlı yüksek direnç ilk olarak 1983 yılında Murray ve ark. (18) tarafından gösterilmiştir. Neyse ki beta laktamaz üreten suşlar yaygınlık göstermemektedir. Çınar ve ark. (103)'nin 111, Moaddab ve Töreci (104)'nin 198 enterokok suşu ile yaptığı çalışmalarda da beta laktamaz aktivitesi saptanamamıştır. Atina'da yapılan bir çalışmada, Athanasouli ve ark. (105) çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 52 enterokok suşunun hiçbirinde beta laktamaz aktivitesine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Ülkemizde enterokoklarda görülen penisilin direncinden düşük molekül ağırlıklı penisilin bağlayıcı proteinlere (özellikle PBP5) azalmış affinite sorumludur. Çalışmamızda izole edilen 10 VRE suşunun tamamı penisiline dirençli iken hiçbirinde beta-laktamaz aktivitesi saptanamamıştır.

Hemen tüm enterokoklar beta laktam ve glikopeptid antibiyotiklerin bakterisidal etkilerine karşı tolerans gösterirler. Bu nedenle endokardit ve menenjit gibi ağır enterokokal enfeksiyonların tedavisinde bakterisidal sinerji sağlamak için bu antibiyotiklerin aminoglikozidlerle kombinasyonu gereklidir. Bu kombinasyondaki herhangi bir antibiyotiğe direnç olması halinde sinerjistik bakterisidal etki ortadan kalkar. YDAD'nin prevalansı her geçen gün artmaktadır.

Avrupa'da çeşitli ülkelerde yüksek düzeyde aminoglikozid direncinin Slovakya'da %58, Yunanistan'da %55, Hırvatistan'da %50, Avustralya ve Slovenya'da %35, Almanya'da %18 olduğu bildirilmiştir (106). Ülkemizde YDAD farklı oranlarda bildirilmektedir. Çınar ve ark. (103) klinik örneklerden izole ettikleri 111 enterokok suşunda gentamisine ve streptomisine sırasıyla %50,5 ve %41,4 ;Ersoy ve ark. (107) 147 suşta % 31.3, % 34.7; Çaylan ve ark.(108) % 41,%51,5 oranlarında direnç bildirmişlerdir. Moaddab ve Töreci (104) dışkı ve klinik örneklerden izole ettikleri 298 suşun %18'i streptomisine, %13'ü de gentamisine yüksek düzeyde dirençli bulunmuştur. Avrupa'da çok merkezli bir çalışmada Türkiye % 48.1 oranı ile ikinci en yüksek YDAD'e sahip ülke olarak bildirilmiştir (100). Mete ve ark. (110) 38 VRE suşunda %90 oranında YDAD saptamışlardır. Bizim izole ettiğimiz 10 suşun dördünde gentamisine, bir suş dışında da tamamında streptomisine yüksek düzeyde direnç saptanmıştır.

VRE enfeksiyonlarının tedavisi için umut vadeden iki yeni antibiyotik olan quinupristin/dalfopristin ve linezolid direnç saptanmamıştır.

Enterokoklardaki vankomisin direncinin (Van B ve Van C) saptanmasında otomatize sistemlerin tümünde problemler yaşandığı bildirilmektedir. VITEK 2 Compact ile vankomisin direncinin belirlenmesinde sadece Van C2 tipi direncin saptanmasında zorluk olduğu bildirilmiştir (113). Ancak otomatize AST sistemleri ile VRE'lerin doğru tespit edildiğine dair titiz çalışmalar yoktur. Çalışmamızda şüpheli olan tüm suşlarda MİK değerlerini aynı anda hem VITEK 2 Compact AST sistemi ile hem de E-test ile araştırılmış ve her iki yöntemle de paralel sonuçlar elde edilmiştir. Bunun sebebi tüm suşlarımızın Van A fenotipinde olması ve glikopeptid MİK değerlerinin çok yüksek (>256) olması olabilir.

Çalışmamızda direnç fenotipinin doğrulamasında için multiplex PCR yöntemi kullanılmıştır ve tüm suşların van A genotipinde olduğu saptanmıştır. Türkiye'de bugüne kadar bildirilmiş olan tüm VRE suşları Van A fenotipindedir. ABD'de ve Avrupa'da Van A tipi direnç daha sık görülmektedir. Ayrıca *E. faecium*'da diğer türlere kıyasla Van A tipi direnç daha sık görülmektedir. Bu

nedenle izolatlarımızın Van A fenotipinde olması beklenmeyen bir durum değildir.

PFGE ile genotiplendirdiğimiz 10 suşun da klonal ilişkili olduğu görülmüştür. 7 suş identik, 2 suş da bu yedi suşla yakın ilişkili bulunmuştur. Sadece tek bir suş identik suşlarla muhtemel ilişkili bulunmuştur. PFGE analizi hastanemizin pediatri yoğun bakım ünitesinde bir VRE salgını yaşandığını göstermektedir. Enterokokal enfeksiyonların, genellikle hastanın kendi florasından kaynaklanan endojen enfeksiyonlar olduğu düşünülmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, VRE dahil tüm enterokokların hastadan hastaya direkt transferinin veya indirekt olarak kontamine eller, kontamine yüzeyler ya da tıbbi cihazlar yoluyla transferinin mümkün olduğunu da göstermektedir. Hastanemizde tespit ettiğimiz bu salgın da eksojen yayılımı göstermiştir. Hastaların aynı dönemde aynı klinikte yatıyor olmaları, aynı personelden bakım almaları ve özellikle 2 nolu hastada VRE kolonizasyonu saptanmadığı halde bakteremi gelişmesi bulaşın personel tarafından transfer edilmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Vankomisin direnci gelişmesi ile vankomisin ve diğer geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı arasında bir ilişki olduğu açıktır. Vankomisin kullanımının sınırlandırıldığı bazı merkezlerde VRE kolonizasyon ve enfeksiyonlarının azaldığı görülmüştür (101). Bu nedenle glikopeptid antibiyotiklerin hayatı tehdit eden enfeksiyonlara saklanması ve mecbur kalınmadıkça empirik uygulanmaması en akılcı yaklaşım olarak görünmektedir. Bununla birlikte bildirilen yüksek düzeyde aminoglikozid direnci, enterokok enfeksiyonlarında beta-laktam/aminoglikozid kombinasyon tedavisinin etkinliği ile ilgili soru işaretleri oluşturmaktadır.

Hastanemizde ilk defa 2002 yılında van A genotipine sahip 2 *E. faecium* gastrointestinal taşıyıcılığı saptanmıştır (111). Ayrıca 2005 yılında hastanemizde 6 aylık bir sürede haftalık sürveyans kültürleri ile 420 hastanın 25'inden (%5,9) VRE izole edilmiştir. Bu suşların 21'i *E. faecium* olarak tanımlanmış ancak

suşlarda direnç genotipi ve genetik yakınlığın tespiti için moleküler testler yapılmamıştır.

Tüm bu gelişmeler hastanemizde vankomisine dirençli *E. faecium* enfeksiyonlarının karşımıza çıkmaya devam edeceği ve muhtemelen de artacağı konusunda endişe yaratmaktadır. Karşımıza çıkması kuvvetle muhtemel olan bu sorunun daha ciddi boyutlara ulaşmaması için enfeksiyon kontrol önlemlerinin titizlikle uygulanması, süreklilik göstermesi ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı şarttır. Ayrıca hastaların hastaneye kabulleri sırasında VRE kolonizasyonu yönünden araştırılması ve hasta kayıtlı bilgileri içinde VRE kolonizasyon durumunun yer alması da VRE enfeksiyon kontrolünde etkin bir yöntem olabilir.

6.SONUÇLAR

- Mayıs 2006 – Mayıs 2007 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanes yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalardan haftada bir kez alınan dışkı, rektal veya perirektal sürüntü örneklerinde VRE varlığı araştırıldı. Ayrıca herhangi bir klinik örnekte patojen olarak saptanan enterokok suşlarında vankomisin ve/veya teikoplanin direnci saptanan suşlar da çalışmaya dahil edildi. Bir hastadan birden fazla izole edilen VRE suşları çalışmaya dahil edilmedi.
- 5309 klinik örneğin 529'undan patojen olarak izole edilen enterokokların 3'ü (%0,5) vankomisine dirençliydi. 1200 sürveyans kültürünün (rektal sürüntü, dışkı veya perianal sürüntü) 58'inde (%4,8) VRE saptandı. 260 yoğun bakım ünitesi hastasının yedisinde (%2) enfeksiyon etkeni/kolonizan olarak VRE izole edildi.
- Çalışmamız süresince dördü klinik örnek altısı rektal sürüntü kültüründen olmak üzere 7 hastadan 10 VRE suşu izole edilmiştir. YBÜ'de yatma ve hastanede yatış süresinin uzunluğu, uzun süre vankomisin ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alma ve hastanede uygulanan invaziv girişimlerin VRE kolonizasyonu ilişkili olduğu görülmüştür.
- Vankomisine dirençli bulunan suşların hepsi *E. faecium* olarak identifiye edildi.
- Suşların tamamının E-test ile belirlenen vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri >256 mg/L idi.

- Şüpheli olan tüm suşlarda glikopeptid MİK değerlerini aynı anda hem VITEK 2 Compact AST sistemi ile hem de E-test ile araştırılmış ve her iki yöntemle de paralel sonuçlar elde edilmiştir.
- Suşlarımızın tamamı penisiline yüksek düzeyde dirençli bulunmuştur . Ancak hiçbirinde beta-laktamaz aktivitesi saptanmamıştır. 10 suşun dördünde gentamisine, bir suş dışında da tamamında streptomisine yüksek düzeyde direnç saptanmıştır. Yüksek oranda bulduğumuz penisilin ve yüksek düzeyde aminoglikozid direnci bu suşlarla oluşacak enfeksiyonlarda kombinasyon tedavisinde problemler yaşanacağını göstermektedir.
- VRE enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan iki yeni antibiyotik olan quinupristin/dalfopristin ve linezolide direnç saptanmamış olması memnuniyet vericidir.
- Multiplex PCR yöntemi ile tüm suşların van A genotipinde olduğu saptanmıştır. Türkiye’de bugüne kadar bildirilmiş olan tüm VRE suşları Van A fenotipindedir.
- PFGE ile genotiplendirdiğimiz 10 suşun da klonal ilişkili olduğu görülmüştür. 7 suş identik, 2 suş da bu yedi suşla yakın ilişkili bulunmuştur. Sadece tek bir suş identik suşlarla muhtemel ilişkili bulunmuştur. PFGE analizi hastanemizin pediatri yoğun bakım ünitesinde bir VRE salgını yaşandığını göstermiştir.
- Bu çalışmanın sonuçları hastanemizde vankomisine dirençli *E. faecium* enfeksiyonlarının karşımıza çıkmaya devam edeceği ve muhtemelen de artacağı konusunda ipuçları vermiştir. Karşımıza çıkması kuvvetle muhtemel olan bu sorunun daha ciddi boyutlara ulaşmaması için

enfeksiyon kontrol önlemlerinin titizlikle uygulanması, süreklilik göstermesi ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı şarttır.

- Sonuç olarak glikopeptidler hala enterokoklara karşı en etkili ajanlardır. Ancak gereksiz kullanılmaları VRE sıklığının artmasına ve tedavide çaresiz kalmamıza yol açabilir. Bu nedenle glikopeptid antibiyotiklerin hayatı tehdit eden enfeksiyonlara saklanması ve mecbur kalınmadıkça empirik uygulanmaması en akılcı yaklaşım olarak görünmektedir.
- Hastaların hastaneye kabulleri sırasında VRE kolonizasyonu yönünden araştırılması ve hasta kayıtlı bilgileri içinde VRE kolonizasyon durumunun yer alması da VRE enfeksiyon kontrolünde etkin bir yöntem olabilir.

KAYNAKLAR

1. Thiercelin, M. E. 1899. Sur un diplocoque saprophyte del'intestin susceptible de devenir pathogene. C. R. Soc. Biol. 5:269-271.
2. Murray BE. Enterococci. In: Gorbach, Bartlett, Blacklow (ed). Infectious Diseases Philadelphia: WB Saunders,1998:1723-1730.
3. Kalina AP. The taxonomy and nomenclature of enterococci. Int J Syst Bacteriol 1970,20:185-189,.
4. Schleifer, K. H., and R. Kilpper-Balz. 1984. Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. As Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov. nt. J. Syst. Bacteriol. 34:31–34.
5. Winn W , Stephan A, Janda W. Koneman EW, Procop G, Schreckenberger P,.Woods G Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology: Baltimore,Philadelphia: Lippincott Williams& Wilkins, 2006.
6. Moellering RC. Enterococcus Species, Streptococcus bovis, and Leuconostoc Species. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). In:Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, New York: Elseiver/Churchill-Livingstone, 2005:2411-2417.

7. Facklam RR, Sahm DF, Teixeria LM. Enterococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH (ed). Manual of Clinical Microbiology Washington D.C.: ASM Press, 1999:297-305
8. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Procop G, Woods G. Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Co 2005:700-711
9. Holm SE, Mascini EM. Streptococci and Related Genera. Armstrong D, Cohen J (ed). In: Infectious Diseases: Barcelona: Mosby, 1999:14.13-14.16
10. Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG: Vancomycin-resistant enterococci, Clin Microbiol Rev 2000;13:686
11. Vural T, Şekercioğlu AO, Öğünç D, ve ark. Vankomisine dirençli E. faecium suşu. Ankem Derg, 1999; 13: 1 – 5.
12. Robert C., Moellering J. R. Enterococcus species bovis and Leuconostoc species. Principles and Practise of Infectious Disease 5th edition. Churchill – Livingstone; 2000; 2147 – 53.
13. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA Medical Microbiology: St Louis.Missouri: Mosby, 2002
14. Başustaoğlu A, Aydoğan H. Enterokoklar. Ed: Uzun Ö.İnfeksiyon Hastalıkları Serisi. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2002;5(2):45-60.

15. Kaye D. Enterococci. Biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. *Arch. Intern. Med.* 1982; 142: 2006 – 9.
16. Krieger J. N., Kaiser D. L., Wenzel R. P. Urinary tract etiology of bloodstream infections in hospitalize patients. *J. Infect. Dis.* 1983; 148: 57 –62.
17. Linden P.K., Pasculle A.W., Manez R., et al. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *E. faecium* or vancomycin susceptible *E. faecium*. *Clin. Infect. Dis.* 1996; 22: 663 -70.
18. Murray BE, Mederski-Samoraj B. Transferable beta-lactamase a new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest* 1983; 72: 1168-1171
19. Anderson DJ, Murdoch DR, Sexton DJ et al. Risk factors for infective endocarditis in patients with enterococcal bacteremia: a case-control study. *Infection.* 2004;32:72-77
20. Coudron P.E., Myhall C. G., Facklam R. R., et al. *Streptococcus faecium* outbreak in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 1044-8.

21. Şardan YÇ. Enterokoklarda direnç sorunu. Ed: Şardan YÇ. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2004:10-16.

22. Murray B. E. The life and times enterococcus. Clin. Microbiol. Rev. 1990; 3:45 – 65.

23. Başustaoğlu A. Enterokoklarda antibakteriyel direnç mekanizmaları ve direnç sorunu. Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2004: 141-158.

24. Lefort A, Mainandi JL, Tod M, Lortholory O. Antienterococcal antibiotics. Med Clin North Ame 2000; 6:1471-1495.

25. Gültekin M. Enterokoklar: Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenez. Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004: 121 – 40.

26. Murray BE, Mederski-Samoraj B. Transferable beta-lactamase a new mechanism for in vitro penicillin resistance in Streptococcus faecalis. J Clin Invest 1983; 72: 1168-1171

27. Markowitz S. M., Wells V. D., Williams D. S., Stuart C. G., et al. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of β -lactamase-producing aminoglycoside-resistant isolates of Enterococcus faecalis. Antimicrob. Agents Chemother. 1991; 35 (6): 1075 – 80.

28. Çınar T., Lelebicioğlu H., Eroğlu C., Sünbül M. Enterokoklarda penisilinaminoglikozid sinerjizminin araştırılması. *Klinik Dergisi*; 1999; 12 (1): 39 – 42.
29. Eliopoulos, G. M. 1997. Vancomycin-resistant enterococci: mechanism and clinical relevance. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 11:851-865
30. Wu, Z., G. D. Wright, and C. T. Walsh. 1995. Overexpression, purification and characterization of VanX, a D-,D-dipeptidase which is essential for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry* 34:2455-2463
31. Uttley, A. H. C., C. H. Collins, J. Naidoo, and R. C. George. 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* i:57-58
32. Bugg, T. D. H., G. D. Wright, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, and C. T. Walsh. 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* 30:1408-1415.
33. Arthur, M., C. Molinas, S. Dutka-Malen, and P. Courvalin. 1991. Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Gene* 103:133-134
34. Reynolds, P. E., F. Depardieu, S. Dutka-Malen, M. Arthur, and P. Courvalin. 1994. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546

requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol. Microbiol.* 13:1065-1070

35. Evers, S., D. F. Sahm, and P. Courvalin. 1993. The *vanB* gene of *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala, D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins VanA and VanC. *Gene* 124:143-144

36. Quintiliani, R., Jr., and P. Courvalin. 1994. Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant *vanB* between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* 119:359-364

37. Perichon, B., P. Reynolds, and P. Courvalin. 1997. VanD type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2016-2018

38. Ostrowsky, B. E., N. C. Clark, C. Thuvn-Eliopoulos, L. Venkataraman, M. H. Samore, F. C. Tenover, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., and H. S. Gold. 1999. A cluster of VanD vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: molecular characterization and clinical epidemiology. *J. Infect. Dis.* 180:1177-1185

39. Fines, M., B. Perichon, P. Reynolds, D. F. Sahm, and P. Courvalin. 1999. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2161-2164

40. Mckessar S.J., Berry A.M., Bell J.M., et al. Genetic characterization of *van G*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000;44(11):3224-8.
41. Fraimow HS, Jungkind DL, Lander DW, Delso DR, Dean JL. Urinary tract infection with an *Enterococcus faecalis* isolate that requires vancomycin for growth. *Ann Intern Med.* 1994;121:22–6.
42. Green M, Shlaes JH, Barbadora K, Shlaes DM. Bacteremia due to vancomycin-dependent *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis.* 1995;20:712–4.
43. Kutlu SS, Dokuzoğuz B. Enterokok infeksiyonlarında tedavi seçenekleri. Ed: Ünal S, Vahapoğlu H. *Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar*. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2004: 23-32.
44. Kawalec M, Gniadkowski M, Kedzierska J, Skotnicki A, Fiett J, Hryniewicz W. Selection of a teicoplanin-resistant *Enterococcus faecium* mutant during an outbreak caused by vancomycin-resistant *enterococci* with the VanB phenotype. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4274-4282
45. Herrero IA, Issa NC, Patel R. Nosocomial spread of linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 2002;346:867-868
46. McNeil SA, Clark NM, Chandrasekar PH, Kauffman CA. Successful treatment of persistent vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia

with linezolid after failure of treatment with Synercid (quinipristin/dalfopristin). Clin Infect Dis, 2000; 30:403-404

47. Boyce, J. M., S. M. Opal, J. W. Chow, M. J. Zervos, G. Potter-Bynoe, C. B. Sherman, R. L. Romulo, S. Fortna, and A. A. Medeiros. 1994. Outbreak of multi-drug resistant *Enterococcus faecium* with transferable VanB class vancomycin resistance. J. Clin. Microbiol. 32:1148-1153

48. Jordens, J. Z., J. Bates, and D. T. Griffiths. 1994. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J. Antimicrob. Chemother. 34:515-528

49. Montecalvo, M. A., H. deLancestre, M. Carraher, C. Gedris, M. Chung, K. Van Horn, and G. P. Wormser. 1995. Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 16:680-685

50. Edmond, M. B., J. F. Ober, J. D. Dawson, D. L. Weinbaum, and R. P. Wenzel. 1996. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: natural history and attributable mortality. Clin. Infect. Dis. 23:1234-1239

51. Edmond, M. B., J. F. Ober, D. L. Weinbaum, M. A. Pfaller, T. Hwang, M. D. Sanford, and R. P. Wenzel. 1995. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. Clin. Infect. Dis. 20:1126-1133

52. Linden, P. K., A. W. Pasculle, R. Maneaz, D. J. Kramer, J. J. Fung, A. D. Pinna, and S. Kusne. 1996. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin-susceptible *E. faecium*. *Clin. Infect. Dis.* 22:663-670
53. Eliopoulos, G. M. 1997. Vancomycin-resistant enterococci: mechanism and clinical relevance. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 11:851-865
54. Boyce, J. M. 1997. Vancomycin-resistant enterococcus: detection, epidemiology and control measures. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 11:367-384
55. Wade, J. J. 1995. The emergence of *Enterococcus faecium* resistant to glycopeptides and other standard agents—a preliminary report. *J. Hosp. Infect.* 30(Suppl.):483-493
56. Boyce, J. M., L. A. Mermel, M. J. Zervos, L. B. Rice, G. Potter-Bynoe, C. Giorgio, and A. A. Medeiros. 1995. Controlling vancomycin-resistant enterococci. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 16:634-637
57. Clinical and Laboratory Standard Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement, CLSI Document M100- S16, Wayne, PA (2006).
58. Gould, F. K., and R. Freeman. 1993. Nosocomial infection with microsphere beds. *Lancet* 342:241-242

59. Karanfil, L. V., M. Murphy, A. Josephson, R. Gaynes, L. Mandel, B. C. Hill, and J. M. Swenson. 1992. A cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 13:195-200
60. Livornese, L. L., S. Dias, C. Samel, B. Romanowski, S. Taylor, P. May, P. Pitsakis, G. Woods, D. Kaye, and M. E. Levison. 1992. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann. Intern. Med.* 117:112-116
61. Mato, R., H. deLancestre, M. Carraher, R. B. Roberts, and A. Tomasz. 1996. Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City Hospital. *Microb. Drug Resist.* 2:309-317
62. Green, M., J. H. Shlaes, K. Barbadora, and D. M. Shlaes. 1995. Bacteremia due to vancomycin-dependent *Enterococcus faecium*. *Clin. Infect. Dis.* 20:712-714
63. Boyce JM, Opal SM, Chow JW, Zervos MJ, Potter-Bynoe G, Sherman CB, Romulo RL, Fortna S, Medeiros AA. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol* 32: 1148, 1994.
64. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, Pfaller MA, Hwang T, Sanford MD, Wenzel RP. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: Risk factors for infection. *Clin Infect Dis* 20: 1126, 1995.

65. Montecalvo MA, Shay DK, Patel P, Tasca L, Maloney SA, Jarvis WR, Wormser GP. Bloodstream infections with vancomycin-resistant enterococci. *Arch Intern Med* 156:1458-1462, 1996.
66. Perl T. M. The threat of vancomycin resistance. *Am J Med* 1999;3;106(5A): 26- 37.
67. Pest V., Tallon C. S., Sanchez A., et al. Epidemiological, microbiological, clinical and prognostic factors of bacteremia caused by high-level vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.* 2000; 19: 742 – 9.
68. Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Recommendations for preventing spread of vancomycin resistance. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 16:105-113
69. Landman D, Quale JM, Oydna E, Willey B, et al. Comparison of selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 751-752.
70. Gambarotto K., Ploy M. C., Turlure P., et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a Cattle-Rearing area of France. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (2): 620 – 4

71. Lees E., Barton R. C. Selective media for detecting gastrointestinal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995; 23 (3): 119 - 22.
72. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1999. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Publication M7-A4, 4th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
73. Swenson, J. M., M. J. Ferraro, D. F. Sahm, P. Charache, and F. C. Tenover. 1992. New vancomycin disk diffusion breakpoints for enterococci. The National Committee for Clinical Laboratory Standards Working Group on Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 30:2525-2528
74. Endtz, H. P., N. Van Den Braak, A. Van Belkum, Wil. H. Goessens, D. Kreft, A. B. Stroebel, and H. A. Verbrugh. 1998. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 36:592-594
75. Clark, N. C., R. C. Cooksey, B. C. Hill, J. M. Swenson, and F. C. Tenover. 1993. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from US hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2311-2317

76. Satake, S., N. Clark, D. Rimland, F. S. Nolte, and F. C. Tenover. 1997. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35:2325-2330
77. Morrison D., Woodford N., Barrett S.P., Sisson P., Cookson B.D. (1999). DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 1084-1091.
78. Weinstein, J. W., S. Tallapragada, P. Farrel, and L. M. Dembry. 1996. Comparison of rectal and perirectal swabs for detection of colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 34:210-212
79. DeLisle S., Perl T. M. Vancomycin-resistant enterococci: A road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest.* 2003; 123: 504 – 18.
80. Montecalvo, M. A., K. Seiter, and C. A. Carbonaro. 1995. Effect of novobiocin-containing antimicrobial regimens on infection and colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:794
81. Chia, J. K. S., M. M. Nakata, S. S. Park, R. P. Lewis, and B. McKnee. 1995. Use of bacitracin therapy for infection due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin. Infect. Dis.* 21:1520

82. O'Donovan, C. A., P. Fan-Havard, F. T. Tecson-Tumang, S. M. Smith, and R. H. Eng. 1994. Enteric eradication of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with oral bacitracin. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 18:105-109

83. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighth informational supplement. NCCLS document M100–S8. NCCLS, Villanova, PA.

84. Bell, J. M., Paton, J. C. & Turnidge, J. (1998). Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbiol* 36, 2187–2190

85. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing and B. Swaminathan. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.

86. Martone W. J. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1998; 19: 539– 45.

87. Huycke M. M., Sahm D. F., Gilmore M. S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4: 239 – 49.

88. Rosenberg J, Jarvis WR, Abbott SL, Vugia DJ: California Emerging Infections Program. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in San Francisco Bay area hospitals during 1994 to 1998, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:408-12.

89. Jordens JZ, Bates J, Griffiths DT: Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, *J Antimicrob Chemother* 1994;34:515.

90. Van der Auwera P, Pensart N, Korten V, Murray BE, Leclercq R: Influence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptide-resistant enterococci, *J Infect Dis* 1996;173:1129.

91- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 1988;319:157-61

92. Öngen B, Gürler N, Akova M, et al. First report of the clinical isolation of vancomycin resistant *E. faecalis* in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7 (Suppl 1): 92.

93. Celkan T, Apak H, Özkan A, Özer Y, Diren Ş, Yıldız İ. Bir hematoloji servisinde vankomisine dirençli enterokok sepsisi ve kolonizasyonu. *ANKEM Derg* 2004;18(3):176-179.

94. Ertek M, Yazgı H, Aktaş E, Erol S, Taşyaran M. Vankomisine dirençli enterokok kolonizasyonu araştırılması ve diğer antimikrobijallere duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi* 2003; 17 (4): 447-451

95. Ceryan N, Ülkar GB, Gürbüz OA, Apaydın N, Oskovi H, Mert A. Enterokoklarda glikopeptid direnci [Özet]. In: Cengiz AT, Erdem B, Dolapçı Gİ, Tekeli FA, eds. XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (8-13 Ekim 2000, Antalya) Program ve Özet Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti & Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 2000:380

96. Ağuş N, Aydan S, Özkalay S, Cengiz A. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* 2006;20(3):145-147.

97- Gazi H, Kurutepe S, Sürücüoğlu S, ecemiş T, Özbakkaloğlu B. Hastane kökenli enterococcus faecalis ve enterococcus faecium suşlarında antimikrobiyal direnç. *ANKEM Derg* 2004;18(1):49-52.

98. Centers for Disease Control and Prevention: Nosocomial enterococci resistant to vancomycin—United States 1989-1993, *Morb Mortal Weekly Rep* 1993;42:597.

99. Handwerger S, Raucher B, Altarac D, et al. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin and gentamicin. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 750-755.

100. Fridkin SK, Edwards JR, Couval JM, et al. The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 US adult intensive care units. *Ann Intern Med* 2001; 135: 175-178.

101. Kolar M, Vagnerova I, Pantucek R, Cermak P. Impact of rational antibiotic usage on occurrence of vancomycin-resistant enterococci in hematological patient. *Clin Microbial Infect* 2001; 7: 91.

102. Kılıç A, Demıray T, Saraçlı MA, Bahar G, Aydoğan H, Baysallar M, Doğançlı L: Bacteriological characterization of vancomycin-resistant enterococci in a pediatric hospital in Turkey. *Annals of Microbiology* 2004; 54 (4): 191-199

103. Çınar T, Leblebicioğlu H, Sünbül M, Eroğlu C, Esen Ş, Günaydın M. Enterokoklarda yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direncinin araştırılması. *Flora* 1999; 4(2):114-9

104. Moaddab S, Töreci K. Enterokok suşlarında tür tayini, vankomisin ve diğer bazı antibiyotiklere direnç aranması. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 2000; 30:77-84

105. Athanasouli EA, Pournaras S, Siristatidis N, Kossou M, Maniatis A, Pangalis A. Molecular epidemiology of *Enterococcus* spp. from children's bacteremia [Abstract]. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(Suppl 1):90

106. Gürler N: Hastanede sorun olan mikroorganizmalar: Gram pozitif koklar. 3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongre Kitapçığı, Samsun, 2003;36-39.

107. Ersoy Y, Şerefhanoğlu K, But AD, Fırat M, Bilişik G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokokların bazı antibiyotiklere duyarlılıkları X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 15-19 Ekim, 2001, ADANA

108. Çaylan R, ÜstünakınM, Kadımov V,Aydın K, Köksal İ: Fekal ve klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları,Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004;34:24-8.

109. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A: Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:816.

110. Mete B, Saraçlı MA, Aygün G, Özaras R, Utku T, Demirkıran O, ienerK, MertA, Tabak F, Doğancı L, DikmenY, Öztürk R. Vankomisine dirençli enterokok salgınının epidemiyolojik, klinik ve mikrobiyolojik olarak irdelenmesi ANKEM Derg 2005;19 (Ek 1)

111. Durmaz G, Aslan V, Kanan B, Us T, Gülbaş Z, Akgün Y. Hematolojik malignensili hastalarda sürveyans kültürleri ile saptanan vankomisin dirençli enterokok (VRE) ve methicillin dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) kolonizasyon sıklığı: İnfeksiyon Dergisi 2002; 16 (2): 171-174

112. Gündeş SG, Willke A, Karadenizli A, Ateş B: kocaeli üniversitesi hastanesi'nde ilk vankomisine dirençli enterokok izolasyonunu takiben yapılan nokta prevalansı çalışması sonuçları.Klimik Derg 2002;15(3):78-81.

113. Van Den Braak N, W Goessens, A van Belkum, H. A. Verbrugh, H. P. Endtz. 2001. Accuracy of the VITEK 2 system to detect glycopeptide resistance in enterococci. J. Clin. Microbiol. 39:351-353.

114. Murray B E, Singh K V, Heath J D, Sharma B R, Weinstock G M. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. J Clin Microbiol. 1990;9:2059–2063. . (Erratum, 2:418, 1991.).