

**MALATYA, KAYSERİ VE ELAZIĞ TIP FAKÜLTESİ HASTANELERİNDE
İZOLE EDİLEN ENTEROKOK SUŞLARINDA
GLİKOPEPTİD DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

INVESTIGATION OF GLYCOPEPTIDE RESISTANCE IN ENTEROCOCCAL
STRAINS ISOLATED FROM MALATYA, KAYSERİ AND
ELAZIĞ MEDICAL FACULTY HOSPITALS

*Yasemin ERSOY**, *Emine SÖNMEZ**, *Hilary J. YOUNG***
*Esra AĞEL****, *Bengül DURMAZ****

ÖZET: Çoklu antibiyotik direnci göstermeleri ve nozokomiyal enfeksiyonlardaki etkenler arasında sıklıkla saptanıyor olmaları sebebiyle enterokoklar artan bir öneme sahiptirler. Ülkemizde enterokoklar arasında glikopeptid direnç insidansı ve genotipik direncin ayrıntıları bilinmemektedir. Bu çalışmada Malatya, Kayseri ve Elazığ Üniversiteleri Tıp Fakültesi Hastanelerinde Ocak 1998-Eylül 1999 tarihleri arasında klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarında glikopeptid direncinin fenotipik ve genotipik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya alınan toplam 235 enterokok suşunun agar dilüsyon metodu ile vankomisin ve teikoplanin için MİK değerleri saptanmış, teikoplanine dirençli suşa rastlanmazken, vankomisine düşük düzey direnç gösteren ($4\mu\text{g}/\text{ml} \leq \text{MİK} \leq 12\mu\text{g}/\text{ml}$) 11 suşun genotipik direnç analizi tek aşamalı polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılmıştır. Sonuç olarak, 11 suşun 7'sinde *vanC*₁ geni, 2'sinde *vanC*₂₋₃ geni saptanmış, buna karşın 2'sinde hiçbir genotipik direnç saptanamamıştır. Ayrıca suşlarda *vanB* direnç genine rastlanılmamıştır. Bulgularımız, Malatya ve komşu illerinde enterokoklar arasında vankomisin direnç insidansının hala düşük olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Enterokoklar, glikopeptid direnci, genotipik analiz.

SUMMARY: Enterococci are now receiving increased attention because of their resistance to multiple antimicrobial drugs, which probably explain their importance in nosocomial infections. The incidence of glycopeptide resistance of enterococci and detailed information about resistance genes has not yet been well recognized in our country. The aim of this study was to investigate the phenotypic and genotypic resistance of enterococci to glycopeptides, which

* İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Malatya.

** Dundee Üniversitesi Mikrobiyoloji Departmanı, İskoçya, İngiltere.

*** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.

were isolated from clinical specimens of patients in Medical Faculty Hospitals of Malatya, Kayseri and Elazığ Universities between the period from January 1998 to September 1999. A total of 235 enterococcus strains were included to the study and MIC values of vancomycin and teicoplanin for all isolates were determined by agar dilution method. All isolates were found to be susceptible to teicoplanin, but 11 strains showed intermediate resistance to vancomycin ($4\mu\text{g}/\text{ml} \leq \text{MIC} \leq 12\mu\text{g}/\text{ml}$), while others were all susceptible. The vancomycin resistance genes of these 11 strains were investigated by single step polymerase chain reaction. As a result, *vanC* genes were detected in 7 strains and *vanC*₂₋₃ genes in 2 strains, while there were no resistance genes in the other 2 isolates. In none of the strains *vanB* genes were positive. In conclusion, it has been suggested that the incidence of vancomycin resistance of enterococci in our region is not as high as in the other countries.

Key words: Enterococci, glycopeptide resistance, genotypic analysis.

GİRİŞ

Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nden ilk glikopeptidlere dirençli enterokok suşlarının 1988-1989 yıllarında bildirilmesinin ardından tüm dünyadan bu suşlar bildirmeye başlamıştır¹⁻⁴. Hastalık Kontrol Merkezinin (Centers for Diseases Control, CDC) nozokomiyal enfeksiyon sürveyans analizleri, vankomisin dirençli enterokoklara (VRE) bağlı nozokomiyal enfeksiyonlarda 20 kat artış olduğunu göstermiştir⁵. Ülkemizde ise enterokoklar arasında glikopeptid direnci hakkında geniş çaplı ve ayrıntılı veriler olmayıp vankomisine yüksek düzey dirençli VANA fenotipinde ilk suş 1997 yılında izole edilmiştir⁶.

Enterokoklarda VANA, VANB, VANC, VAND ve VANE olmak üzere beş farklı fenotipik direnç mevcut olup vankomisin ve teikoplanine direnç durumuna göre tanımlanır. Başlıca dirençli tür *E.faecium*'dur, fakat *E.faecalis* ve diğer suşlarda da saptanabilmektedir. VANA, yüksek düzey vankomisin ($\text{MİK} \geq 64\mu\text{g}/\text{ml}$) ve teikoplanin direncini ($\text{MİK} \geq 16\mu\text{g}/\text{ml}$) gösterir ve indüklenebilir. VANB ise indüklenebilir değişik düzeyde vankomisin direnci gösterirken ($\text{MİK} 4-1000\mu\text{g}/\text{ml}$ arasında değişebilir) teikoplanine duyarlıdır⁷. VANC fenotipi, teikoplanine duyarlı, vankomisine düşük düzeyde dirençli ($2\mu\text{g}/\text{ml} \leq \text{MİK} \leq 32\mu\text{g}/\text{ml}$) olup *E.gallinarum*, *E.casseliflavus* ve *E.flavescens*'de görülür ve aktarılamaz⁸. VAND ve VANE ise son yıllarda saptanmış olup, VAND fenotipinde vankomisine orta düzey ($\text{MİK} = 64\mu\text{g}/\text{ml}$), teikoplanine düşük düzey direnç ($\text{MİK} = 4\mu\text{g}/\text{ml}$) veya duyarlılık mevcuttur⁹. VANE ise Eylül 1999'da *E.faecalis* BM4405 suşunda gösterilmiştir ve vankomisine düşük düzey direnç ($\text{MİK} \leq 16\mu\text{g}/\text{ml}$) ve teikoplanine duyarlılık söz konusudur¹⁰. Birçok araştırmacı, VRE'nin moleküler tiplendirmesi ile bu mikroorganizmanın bölgeler arasında ve aynı şehirdeki hastaneler arasında transfer edilebileceğini göstermiştir^{11,12}.

Bu çalışmada, Malatya'nın yanısıra Kayseri ve Elazığ gibi komşu illerde çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarında glikopeptid direncinin fenotipik ve genotipik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri Suşları: Ocak 1998 - Eylül 1999 tarihleri arasında Turgut Özal Tıp Merkezi, Kayseri Gevher Nesibe Tıp Fakültesi ve Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Mikrobiyoloji laboratuvarlarına gönderilen idrar, yara, kan, serviks kültürlerinden izole edilen 159 ve Turgut Özal Tıp Merkezi yatan hastalar ve poliklinik hastalarının gaita ve rektal sürüntü kültürlerinden izole edilen 76 olmak üzere toplam 235 enterokok suşu çalışmaya alındı. Kontrol olarak direnç paterni iyi belirlenmiş İskoçya Dundee Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümü tarafından sağlanan *E.faecium* NCTC 12202 (*vanA*), *E.faecalis* ATCC 51299 (*VanB*), *E.gallinarum* NCTC 12359^T (*vanC₁*), *E.casseliflavus* NCTC 12361^T (*vanC_{2,3}*), *E.feacium* NCTC 7171^T ve *E.faecalis* NCTC 775^T referans suşları kullanıldı^{13,14}.

Mikrobiyolojik tanımlama: İzole edilen suşlar, koloni morfolojisi, Gram pozitif boyanma, katalaz üretiminin olmayışı, PYR testinin (Oxoid) pozitifliği, %40 safra varlığında eskülin hidrolizi ve %6.5 NaCl'de üreme yeteneklerine bakılarak *Enterococcus spp.* olarak tanımlandı. Skim-milk (Oxoid) saklama ortamında -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

Tür ayırımı: Bu amaçla iki yöntem kullanıldı. Önce API 20 Strep (Bio-Merieux®) tanımlama kitleri ile sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tanımlama primerleri (Genomed Laboratories®) ve yardımcı olarak kimyasal testler ile tür ayırımı yapıldı. PZR tekniği olarak, "Internally transcribed spacer region (ITS)" olarak isimlendirilen ve 16S-23S rDNA'nın (rRNA'yı kodlayan gen) türler arasındaki minimal değişikliklerini gösteren ITS PZR metodu kullanıldı¹⁵⁻¹⁷.

API 20 Strep testleri ile 100 suş çalışıldı. Suşların tamamının tür düzeyinde tanımı PZR ve biyokimyasal testler ile yapıldı. Brain Heart İnfüzyon (BHI) agarda (Difco) bir gece 35°C'de inkübe edilen suşlardan tek koloni alınarak 5 ml BHI sıvı besiyerine ekim yapıldı ve aynı ısıda bir gece tekrar inkübasyona bırakıldı. DNA ekstraksiyonu için 1.5 ml'lik, mikrosantrifüj tüplerine 800 µl distile su ve üzerine 200 µl BHI buyyonda üretilmiş bakteri süspansiyonu kondu. DNA ekstraksiyonu için Clark ve arkadaşları¹² tarafından uygulanan ısı ile denatürasyon metodu kullanıldı. Daha sonra 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan kısım PZR reaksiyonu için kullanıldı.

PZR ile tür ayırımı için Genomed A.Ş. tarafından İngiltere'de sentezlenen 15'er baz içeren bir çift primer kullanıldı. Bunların dizilimi; L1: 5' CAA GGC ATC CAC CGT 3', G1: 5' GAA GTC GTA ACA AGG 3' şeklinde idi¹⁷. Her bir PZR reaksiyonu için toplam volüm 50 µl olarak belirlendi. Reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi idi: 10x reaksiyon buffer 5 µl, dNTP karışımı (2.5 mM) 5 µl, MgCl (25mM) 3µl, steril distile su 12 µl, primer-L1 (50 pikomol/µl) 2µl, primer-G1 (50 pikomol/µl) 2µl ve son olarak kaynatılarak ekstrakte edilmiş bakteri DNA'sı 20 µl eklendi. Hazırlanan reaksiyon tüpleri önceden programlanmış "PTC-200 DNA Engine®" termal cykler" cihazına yerleştirildi, 94°C'de 5 dakika bekledikten sonra "hot start" başlangıçlı amplifikasyon uygulandı¹⁶ ve Taq DNA polimeraz (Promega) 1 U/µl lik solüsyondan 1µl her tüpe dağıtıldı. Amplifikasyonun diğer basamakları ise; 94°C'de 1 dakika (ayrılma), 55°C'de 7 dakika (birleşme), 72°C'de 2 dakika

(uzama) şeklinde yapıldı. Son üç basamak 25 kez tekrarlandı ve 72°C'de 10 dakika bekletilip 4°C'ye soğutulularak amplifikasyon sonlandırıldı¹³.

Amplifikasyon ürünleri 2µl blue-juice (Promega) ve 8µl PZR ürünü şeklinde karıştırılarak 1:100000 etidyum bromür içeren %2'lik agarozda (Tris-borate-EDTA içinde hazırlanmış) 150 voltta elektroforeze tabi tutuldu. Biyo-marker olarak pGEM DNA (Promega) ve λ X174 DNA/Hae III kullanıldı.

UV ışık altında oluşan bant büyüklükleri okundu ve fotoğrafları çekildi. Bant büyüklüğü olarak; 430-600 baz çifti (bp) arasında bant gösteren suşlar *E.faecium*, 300-500 bp arasında iki bant gösterenler ise *E.faecalis*, *E.gallinarum*, *E.casseliflavus* ve diğer türler olarak değerlendirildi¹⁷. Son grupta türler arasındaki ayırımın yapılabilmesi için ise PZR ile tanımlamaya yardımcı olarak biyokimyasal testler kullanıldı. Bu amaçla %1 arabinoz %1 sorbitol ve %2'lik tellürit testleri kullanıldı. Tellürite dirençli, arabinoz negatif olanlar *E.faecalis*, tellürite duyarlı ve sorbitol negatif olup *vanC₁* genotipi gösterenler *E.gallinarum*, tellürite duyarlı ve sorbitol pozitif veya negatif, arabinoz pozitif ve *vanC₂₋₃* genotipi gösterenler ise *E.casseliflavus* olarak değerlendirildi⁸. Ayrıca sarı pigment üretimi, hareket ve koyun kanlı agarda (α-hemoliz yönünden) üreme özellikleri gerekli olan suşların ayırt edilmesinde kullanıldı.

Antibiyotik duyarlılık testleri: İzole edilen suşların vankomisin ve teikoplanin duyarlılığının test edilmesi ve MİK değerlerinin hesaplanması için agar dilüsyon metodu kullanıldı^{18,19}. Antimikrobiyaller 0.125-256 µg/ml dilüsyon aralığında BHİ agarda test edildi. Vankomisin MİK değeri 4 µg/ml ve teikoplanin MİK değeri 8µg/ml üzerinde olan suşlar dirençli kabul edildi²⁰. Dirençli bulunan suşlara ayrıca E-Test (AB BİODISK®) uygulandı.

Genotipik direnç analizi: Fenotipik olarak duyarlılık testleri ile saptanan dirençli suşlar PZR amplifikasyonu ile genotipik olarak direnç analizi çalışmasına alındı. Bakteri DNA'sının ekstraksiyonu için tek koloniden BHİ agara pasajlanan suşlar 35°C'de bir gece inkübe edildi. İki-üç koloni alınarak BHİ buyyona pasaj yapıldı ve bir gece 35°C'de tekrar inkübe edildi. DNA ekstraksiyonu için ısı ile denatürasyon uygulandı. Daha sonra 12000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan kısım PZR reaksiyonu için kullanıldı. PZR ile direnç geni analizi için Genomed A.Ş. tarafından İngiltere'de sentezlenen 17'şer baz içeren 4 çift primer kullanıldı. Oligonükleotidlerin baz dizilimi aşağıda gösterildiği gibiydi²¹.

<i>VanA</i> için (732 bp)*	A1: 5'GGGAAAACGACAATTGC3'
	A2: 5'GTACAATGCGGCAGTTA3'
<i>VanB</i> için (635 bp)*	B1: 5'ATGGGAAGCCGATAGTC3'
	B2: 5'GATTCGTTCCCTCGACC3'
<i>VanC1</i> için (822)*	C1: 5'GGTATCAAGGAAACCTC3'
	C2: 5'CTTCCGCCATCATAGCT3'
<i>VanC2 ve C3</i> için (439 bp)*	D1: 5'CTCCTACGATTCTCTTG3'
	D2: 5'CGAGCAAGACCTTTAAG3'

*: Amplifikasyonu hedeflenen gen parçasının uzunluğunu göstermektedir.

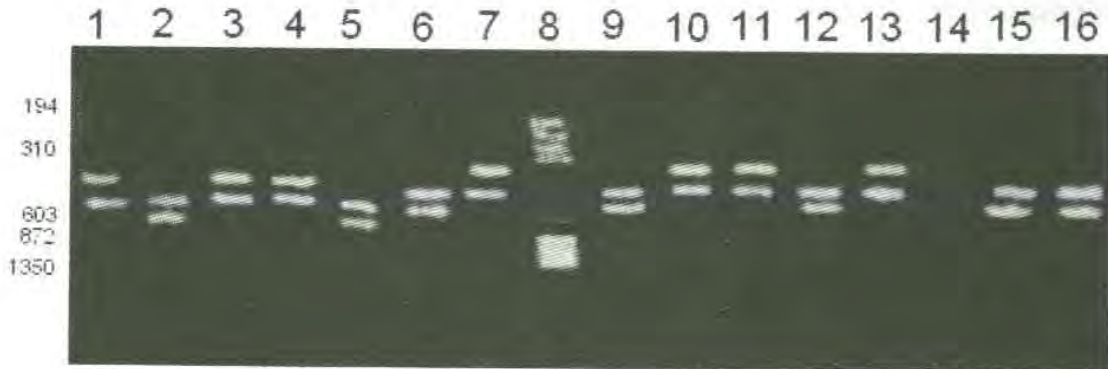
Toplam volüm 50µl olup steril distile su 13µl, dNTP karışımı (2.5 mM) 5 µl, 10x reaksiyon buffer 5 µl, MgCl₂ (25 mM) 3 µl, primer çifti (50 pikomol/µl) 2 µl ve Taq DNA polimeraz (Promega) 1 U/µl'lik solüsyondan 1µl ve son olarak bakteri DNA'sından 20 µl eklenerek karışım hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon tüpleri önceden programlanmış "PTC-200 DNA Engine®" (MJ Research) termal cycler" cihazına yerleştirildi ve 94°C'de 2 dakika tek döngü, 94°C'de 1 dakika (denatürasyon), 54°C'de 1 dakika (birleşme) ve 72°C'de 2 dakika (uzama) şeklinde 30 döngü uygulandı. Tüpler 72°C'de 10 dakika bekletilip 4°C'ye soğutulularak amplifikasyon sonlandırıldı¹³.

PZR ürünlerinin elektroforezi yukarıda belirtildiği şekilde yapıldı ve pGEM DNA (Promega) ve λ X174 DNA / Hae III markerlar yardımı ile sonuçlar değerlendirildi.

BULGULAR

Toplam 235 suşun 168'i Malatya, 49'u Kayseri ve 18'i Elazığ bölgesindendi. Örneklerin 65'i (%27.5) yoğun bakım hastalarından, 50'si (%21.2) poliklinik hastalarından, 121'i (%51.3) ise diğer yataklı servislerden gelmişti. Suşların 76'sı gaita, 90'ı idrar, 21'i yara, 46'sı kan ve 2'si serviks örneklerinden izole edildi. Vankomisine yüksek düzey dirençli suş (MİK≥64µg/ml) saptanmazken, MİK değerleri 4-12µg/ml arasında değişen düşük düzey dirençli 11 (%4.66) suş belirlendi. Dirençli bulunan suşlar agar dilüsyon metodu ile tekrar test edildi ve aynı sonuçlar elde edildi. Ayrıca bu suşların E-test ile MİK değerleri doğrulandı. Teikoplanine tüm suşlar duyarlı (MİK<2µg/ml) bulundu.

Suşların tamamının tür tayini, PZR yöntemi ve biyokimyasal testler (tellürit, arabinoz, sorbitol karbonhidrat testleri) ile yapıldı. PZR ve biyokimyasal test sonuçlarına göre 235 suştan; 141'i (%60.4) *E.faecalis*, 85'i (%36.2) *E.faecium*, 6'sı (%2.6) *E.gallinarum* ve 2'si (%0.8) *E.casseliflavus* olarak saptandı (Şekil 1).



Şekil 1: Bazı Enterokok Türlerinin PZR İle Tanımlanması Sonucu Elde Edilen Jel Elektroforez Sonuçları: Sıra 1: *E.faecalis* NCTC775, sıra 2: *E.faecium* NCTC7171, sıra 3: izolat 47 (*E.faecalis*), sıra 4: izolat 48 (*E.faecalis*), sıra 5: izolat 49 (*E.faecium*), sıra 6: izolat 50 (*E.faecium*), sıra 7: izolat 29 (*E.casseliflavus*), sıra 8: fx174/Hae III marker, sıra 9: izolat 52 (*E.faecium*), sıra 10: izolat 53 (*E.faecalis*), sıra 11: izolat 54 (*E.faecalis*), sıra 12: izolat 55 (*E.faecium*), sıra 13: izolat 56 (*E.faecalis*), sıra 14: izolat 57 (enterokok dışı), sıra 15: izolat 58 (*E.faecium*), sıra 16: izolat 59 (*E.faecium*).

Tablo I: Yüz Enterokok Suşunun Tür Düzeyinde Tanımlanmasında API ve PZR Yöntemlerinin Karşılaştırılması

API ile	PZR ile					Toplam N*
	<i>E.faecalis</i> N*	<i>E.faecium</i> N*	<i>E.gallinarum</i> N*	<i>E.casseliflavus</i> N*	Enterokok dışı N*	
<i>E.faecalis</i>	51**	1	–	1	–	53
<i>E.faecium</i>	6	26**	3	1	–	36
<i>E.gallinarum</i>	5	1	–	–	–	6
<i>E.casseliflavus</i>	–	–	–	–	–	–
Enterokok dışı	1	–	–	–	1**	2
<i>E.durans</i>	1	–	–	–	–	1
<i>E.avium</i>	2	–	–	–	–	2
Toplam	66	28	3	2	1	100

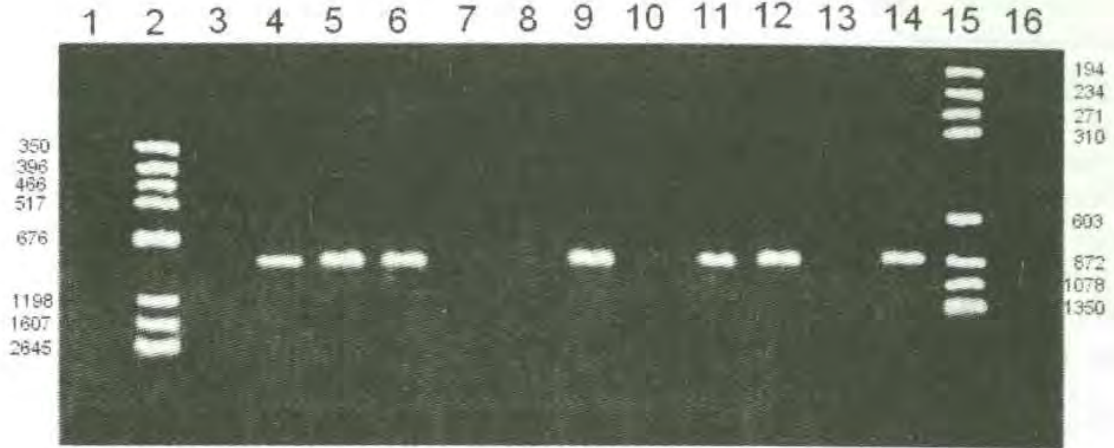
* : Tabloda çalışılan 100 suş değerlendirildiğinden, sayılar aynı zamanda yüzde oranlarını ifade etmektedir.

** : Her iki test ile uyumlu bulunan sonuçlar.

Ayrıca suşların 100 adedi API 20 Strep yöntemi ile de tiplendirildi. Buna göre, 53'ü *E.faecalis*, 36'sı *E.faecium*, 6'sı *E.gallinarum*, 2'si *E.avium*, 1'i *E.durans* olarak belirlenirken 2 suş enterokok dışı olarak saptandı. Hem API Strep hem de PZR ile tanımlanan 100 enterokok suşundan 51'i her iki test ile de *E.faecalis*, 26'sı da *E.faecium* olarak saptandı. Ancak, PZR yöntemi ile *E.gallinarum* olarak belirlenen 3 suş, API testi ile *E.faecium* ve API testi ile *E.gallinarum* olarak saptanan 5 suş PZR yöntemi ile *E.faecalis* olarak belirlendi. Bir suş hem API ve hem de PZR ile enterokok dışı suş olarak tespit edildi. PZR ve API tanımlama yöntemlerinin uyumluluğu %78 olarak bulundu (Tablo I).

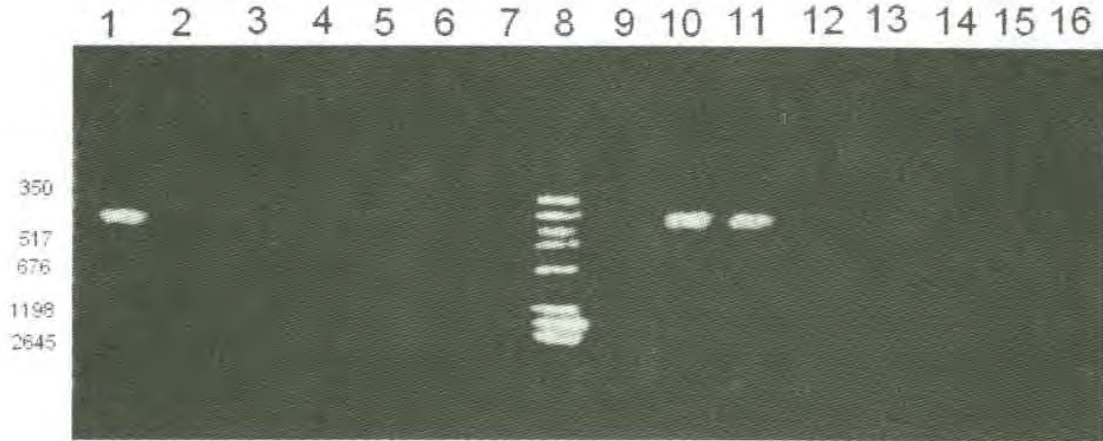
Fenotipik olarak yüksek düzey vankomisin ve teikoplanin direnci saptanmadığı için, VANA fenotipik direnci düşünülmedi. Ancak VANB ve VANC fenotipinin kesin ayrımının yapılması için dirençli bulunan 11 suşta PZR yöntemi ile *vanB*, *vanC₁* ve *vanC_{2,3}* direnç genleri araştırıldı. Dirençli suşlardan 7'sinde *vanC₁* ve 2'sinde *vanC_{2,3}*'e özgül bantlar gözlemlendi (Şekil 2 ve 3).

VanC₁ geni saptanan suşların 5'i gaita, 2'si idrardan, *VanC_{2,3}* geni saptananların her ikisi de gaitadan izole edilmişlerdi. *VanC₁* özgül bant gösterenlerin tamamı "ITS" PZR ve biyokimyasal testler ile *E.gallinarum* olarak, *VanC_{2,3}* gösterenler *E.casseliflavus* olarak tanımlanmıştı. *E.faecalis* olarak belirlenen 2 suşta ise genotipik olarak direnç saptanamadı. Onbir dirençli suşun 6'sı yoğun bakım, 1'i poliklinik ve 4'ü servis hastalarına ait örneklerden izole edilmişti. Bu suşların PZR ile yapılan tür tanımları, gösterdikleri genotipik direnç ile uyumlu iken, API 20 Strep ile yapılan tanım genotipik direnç ile uyum göstermedi (Tablo II).



Şekil 2: Vankomisine Dirençli Bulunan Suşların VanC₁ Geni Primerleri İle Yapılan PZR

Genotipik Analiz Sonuçları: Sıra 2: Biomarker pGEM, sıra 3: negatif kontrol, sıra 4: izolat 6, sıra 5: izolat 45, sıra 6: izolat 63, sıra 7: izolat 29, sıra 8: izolat 204, sıra 9: izolat 205, sıra 10: izolat 215, sıra 11: izolat 227, sıra 12: izolat 229, sıra 13: izolat 218, sıra 14: *E.gallinarum* NCTC12359, sıra 15: fx174/HaeIII marker.



Şekil 3: Vankomisine Dirençli Bulunan Suşların VanC_{2,3} Geni Primerleri İle Yapılan PZR

Genotipik Analiz Sonuçları: Sıra 1: *E.casseliflavus* NCTC12361, sıra 2: negatif kontrol, sıra 3: izolat 6, sıra 4: izolat 45, sıra 5: izolat 63, sıra 6: izolat 204, sıra 7: izolat 205, sıra 8: biomarker pGEM, sıra 9: izolat 218, sıra 10: izolat 29, sıra 11: izolat 215, sıra 12: izolat 227, sıra 13: izolat 229, sıra 14: izolat 230.

TARTIŞMA

Vankomisine dirençli enterokok (VRE) insidansı ABD'de %14 olarak saptanırken, Avrupa'da %2.5'dan az olarak bildirilmektedir^{12,22}. Avrupa ülkelerinden Belçika ve İtalya'da vankomisin ve teikoplaninin ikisine birden direnç %1'den az iken; İngiltere, Almanya ve Hollanda'da bu oran %1-2 arasında, diğer ülkelerde ise %2'den fazladır²². Ülkemizde ise VANA fenotipinde çoğul dirençli ilk *E.faecium* suşu 1997 yılında Vural ve arkadaşları⁶ tarafından izole edilmiştir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda genotipik olarak direnç analizi ile ilgili verilere rastlanmamıştır.

Tablo II: Vankomisine Dirençli Suşların Özellikleri

Suş No	Örnek	Bölüm	API	PZR	Genotip
006	Gaita	YB	<i>E.faecium</i>	<i>E.gallinarum</i>	<i>VanC₁</i>
029	Gaita	Servis	<i>E.faecium</i>	<i>E.casseliflavus</i>	<i>VanC₂₋₃</i>
045	İdrar	Servis	<i>E.faecium</i>	<i>E.gallinarum</i>	<i>VanC₁</i>
063	Gaita	Poliklinik	<i>E.faecium</i>	<i>E.gallinarum</i>	<i>VanC₁</i>
204	İdrar	Servis	<i>E.faecalis</i> *	<i>E.faecalis</i> *	Saptanamadı
205	İdrar	Servis	<i>E.gallinarum</i> *	<i>E.gallinarum</i> *	<i>VanC₁</i>
215	Gaita	YB	<i>E.faecalis</i>	<i>E.casseliflavus</i>	<i>VanC₂₋₃</i>
218	Gaita	YB	<i>E.faecalis</i> *	<i>E.faecalis</i> *	Saptanamadı
227	Gaita	YB	<i>E.gallinarum</i> *	<i>E.gallinarum</i> *	<i>VanC₁</i>
229	Gaita	YB	<i>E.faecium</i>	<i>E.gallinarum</i>	<i>VanC₁</i>
230	Gaita	YB	<i>E.gallinarum</i> *	<i>E.gallinarum</i> *	<i>VanC₁</i>

* : Her iki test ile uyumlu bulunan sonuçlar, YB: Yoğun Bakım Ünitesi.

Çalışmamızda tüm izolatlar arasında VRE insidansı %4.7 olarak bulunmuş ve kazanılmış direnci ifade eden ve vankomisin ile teikoplanine yüksek direnç gösteren VANA fenotipi tespit edilmemiştir. Vankomisin MİK değeri 4-12µg/ml arasında olan ve teikoplanine duyarlı 11 suşta muhtemel olabilecek *vanB*, *vanC₁* ve *vanC₂₋₃* genotipik dirençlerini araştırdığımızda *vanB* genotipine rastlanmazken, 7 suş *vanC₁*, 2 suş *vanC₂₋₃* genotipi göstermiştir. İki *E.faecalis* suşunda ise genotipik direnç gösterilememiştir. Son iki yıl içinde tespit edilmiş olan *vanD* ve *vanE* genotipleri ise elimizde özgül primerlerin olmaması nedeniyle araştırılmamıştır. Genotipik direnç gösteremediğimiz 2 suşun *E.faecalis* olması, bunların *vanE* geni taşıyabileceklerini düşündürmektedir. Bununla birlikte MİK değerlerinin sırasıyla 4 ve 5 µg/ml gibi sınırda olması, dirençli suşlar olmayabileceklerini düşündürmüş ve bu suşlar için duyarlılık testleri agar dilüsyon ve E-test ile tekrarlandığında da aynı MİK değerleri bulunmuştur.

Klinik örneklerden izole edilen enterokokların %80-90'ının *E.faecalis*, %5-10'unun ise *E.faecium* olduğu bildirilmektedir²³. Bu çalışmada ise ITS PZR tekniği ve biyokimyasal testler ile tüm izolatların %60.4'ü *E.faecalis* ve %36.2'si *E.faecium* olarak tespit edilmiştir. Klinikte enterokokların tür düzeyinde tanımlanması oldukça önemlidir. İntrasek olarak beta-laktam antibiyotikler için yüksek MİK değerine sahip *E.faecium* türleri ve vankomisine düşük düzey direnç gösteren hareketli enterokok türleri, klinisyene tedaviyi yönlendirme açısından ön fikir verecektir. Bazı serilerde tüm enterokoklar arasında VRE oranı yaklaşık %17 olarak saptanırken, *E.faecium* türleri arasında bu oran %48, *E.faecalis*'ler arasında %2.3'dür²⁴.

Tanımlamada kullanılan ve yaygın kabul gören API 20 Strep testinin güvenilirlik oranı bazı çalışmalarda %71.5'e kadar düşmektedir²³. Bizim çalışmamızda ise 100 suşun hem API ile hem de ITS PZR ile tanımlanması sonucunda her iki yöntem arasındaki uyumun %78 olduğu görülmüştür. Diğer bir deyişle 78 suş her iki test ile aynı sonucu vermiştir. Direnç saptanan 11 suşun PZR ile yapılan genotipik direnç analizinde ise 7 suşta *vanC*₁ 2 suşta *vanC*₂₋₃ geni saptanmıştır. İntrensek olarak taşınan bu direnç ancak belli türlerde; *E.gallinarum*, *E.casseliflavus* ve *E.flavescens*'de görülmekte olup bu sonuçlar ITS PZR ile uyumlu, fakat API sonuçları ile uyumsuzluk göstermektedir. Genotipik direnç ile uygunluk göstermesi sebebiyle çalışmamızda ITS PZR tekniğini daha doğru olarak kabul ettik. ITS PZR ve API tekniğinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, enterokokların tür düzeyinde tanımlanmasında API tekniğinin PZR'ye göre daha uyumsuz sonuçlar verdiği bildirilmiştir²⁵. Benzer şekilde Akdeniz Üniversitesi tarafından bildirilen dirençli suş önce API ile *E.casseliflavus* olarak saptanmış, fakat daha sonra diğer bir tanımlama yöntemi olan Sceptor ile *E.faecium* olarak belirlenmiştir⁶.

Bir cinste türler arasındaki küçük değişikliklerle tür ayırımının sağlanmasını amaçlayan ITS-PZR tekniğini, Tyrell ve arkadaşları¹⁷ enterokoklar üzerinde çalışmış ve *E.faecalis*, *E.faecium* yanında diğer bazı türlere özgül bantlar ile ayırım yapılabildiğini bildirmişlerdir. Başka bir araştırmacı ise bu teknikle ilgili olarak, *E.faecium* suşunun özgül bant gösterirken *E.faecalis*'in diğer türlerden ayrımı için ilave biyokimyasal testlere ihtiyaç duyulduğunu ifade etmektedir²⁵. Çalışmamızda ITS-PZR tekniğine ek olarak biyokimyasal testler ve suşların gösterdiği genotipik dirençten de yararlanılmıştır. Diğer bir ilginç nokta ise, ekonomik olarak API 20 Strep testlerinin maliyetinin PZR metoduna göre daha yüksek olmasıdır. PZR tekniğinin dezavantajları, yalnızca gelişmiş olanakların bulunduğu merkezlerde kullanılabilecek bir metod olması ve tek bir suşun tanımlanmasının zahmetli olmasıdır. Ayrıca genotipik direncin saptanması enterokokların tür düzeyinde ayırımında yardımcı olmaktadır.

*VanC*₂₋₃ geni saptanan iki suşun ayrımı için pigmentasyon, hareket testi ve koyun kanlı agarda alfa hemoliz testleri uygulanmış ve her iki suş *E.casseliflavus* olarak değerlendirilmiştir. *E.casseliflavus* ve *E.flavescens*, ne taşıdıkları glikopeptid direncinin genotipik analizi ile ne de PZR temelli tiplendirme metodları ile ayırt edilemezler. Ancak bunlar, *E.flavescens*'in klasik testler olan riboz testini negatif vermesi ve koyun kanlı agarda alfa-hemoliz oluşturmaması ile ayırt edilebilirler²⁶.

Yüksek düzey vankomisin direnci (özellikle VANA) rutin mikrobiyolojik testlerle saptanırken, düşük düzey direnç (VANB, VANC₁, VANC₂₋₃) her zaman rutin testlerde saptanamayabilir. İngiltere'de yapılan bir çalışmada, düşük seviyede vankomisine dirençli suşlar için doğru bildirim oranının ancak %50-54 olduğu saptanmış ve vankomisin konsantrasyonu 5 µg olan disk kullanımının 10, 20, 25, 30 ve 100 µg'lık disk kullanımına göre daha doğru sonuç verdiği bildirilmiştir²⁷. Ayrıca VANC fenotipik direncinin saptanmasında rutin laboratuvar testlerinin yetersiz kaldığı ve ancak %32 oranında doğru tanımlandığı da ifade edilmektedir²⁸. Bir başka çalışmada, yaygın şekilde kullanılan bir yöntem olan

agar tarama metodunun 6 µg/ml vankomisin içermesi sebebiyle düşük düzey direncin saptanmasında yetersiz kaldığı gösterilmiştir¹⁸. Duyarlılık testleri arasında agar dilüsyon metodu en çok kabul gören testlerden biridir²⁹. Ancak National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)'in Müller-Hinton agarı önermesine karşın, enterokoklarda duyarlılık testleri için BHI agarın daha doğru sonuçlar verdiği bildirilmektedir¹⁸. Bu nedenle biz çalışmamızda vankomisin ve teikoplanin MİK değerlerini agar dilüsyon metodu ile BHI agar kullanarak saptadık. Ticari bir test olan E-test ile de dirençli bulunan suşların MİK değerleri uyumlu bulundu.

Avrupa'nın bir çok ülkesinde kümes hayvanlarında büyümeyi artırmak amacıyla bir glikopeptid olan avoparsin kullanımının, VRE izolatlarının ortaya çıkmasından sorumlu olabileceği düşünülmektedir^{30,31}. Avoparsinin uzun süredir hayvan yemlerinde kullanıldığı ülkelerden olan Hollanda'da yapılan bir çalışmada, fekal örneklerde VRE %2 oranında saptanmış olup, tamamı *vanA* genotipi göstermiş ve aynı zamanda tüm suşlar avoparsine de dirençli tespit edilmiştir³². Bu sonuç, bizim sonuçlarımızdan oldukça farklılık göstermektedir. Ancak ülkemizde avoparsinin hayvan yemlerinde kullanımı konusunda yeterli verilere ulaşılamaması sebebi ile bu konuda yorum yapılamamıştır.

CDC'ye 1993 yılında bildirilen enterokok enfeksiyonlarının %7.9'undan VRE sorumlu olup, farklı çalışmalarda fekal taşıyıcılık oranı %5-47 arasında değişmektedir³³. Yıllar arasında bir oranlama yapılırsa, 1989-1995 yılları arasında *vanA* genotipine bağlı VRE insidansında ABD'de 20 kat artış olduğu bildirilmiştir⁹. Ülkemizde kolonizasyon ile ilgili çalışmalar ise son yıllarda yapılmakta olup, bir çalışmada yenidoğan servisinde 110 gaita ve rektal sürüntü örneğinin 8'inde VRE bildirilmiştir³⁴. Ayrıca bu 8 suşun hepsi teikoplanin direnci göstermiş olup fenotipik ve genotipik yönden analiz edilmemişlerdir³⁴.

Bizim çalışmamızda 76 gaita örneğinden izole edilen enterokok suşlarında teikoplanin direnci saptanmazken, 8'inde (%10.5) düşük düzey vankomisin direnci belirlenmiş ve bunların 7'sinin *vanC* genotipi, yani intrensek direnç gösterdiği görülmüştür. Ayrıca 90 idrar örneğinden izole ettiğimiz enterokokların 3'ü (%3.3) düşük düzey vankomisin direnci göstermiş ve bunlardan 2 *E.gallinarum* suşunda *vanC*₁ genotipinde direnç bulunmuştur. Bu sonuç literatürde bildirilenlerle benzer görünmektedir.

Bazı çalışmalarda fekal örneklerde %5.7 oranında VANC VRE saptanırken klinik örneklerin %1.4'ünde aynı fenotip saptanmıştır³⁵. Fekal örneklerde zaman zaman, klinik örneklerde ise daha nadiren saptanan VANC direncinin önemi konusunda henüz yeterli veriler yoktur. Bununla birlikte, hastadan hastaya transfer olmaması sebebi ile VANA ve VANB tiplerinde olduğu gibi enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasına ve kolonizasyon yönünden tarama yapılmasına gerek olmadığını bildiren yayınlar mevcuttur³⁴.

Sonuç olarak, epidemiyolojik ve enfeksiyon kontrolü yönünden önemi olan VANA ve VANB tipi dirençli enterokoklar bölgemizde saptanamamıştır. Ancak bu suşların tüm dünyadan yaygın olarak ve ülkemizde de bazı bölgelerden bildirilmiş

olması, her an bu suşlarla bizim de karşılaşabileceğimizi göstermektedir. Bu nedenle, enfeksiyon kontrolü yönünden önlemlerin ve antibiyotik kullanım protokollerinin daha dikkatli belirlenmesi gerekmektedir. Türkiye genelinde daha çok merkezin katılacağı ve daha geniş kapsamlı karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

TEŞEKKÜR

Kendi bölgelerindeki suşları göndererek çalışmaya katkıda bulunan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Bülent Sümerkan ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Zülal Aşçı'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P: Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 1988, 319: 157-161.
2. Kaplan AH, Gilligan PH, Facklam RR: Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. J Clin Microbiol 1988, 26: 1216-1218.
3. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC: Vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1988, 1: 57-58.
4. Rao GG, Ojo F, Kolokithas D: Vancomycin-resistant Gram positive cocci: Risk factors for faecal carriage. J Hosp Infect 1997, 35: 63-69.
5. Singh-Naz N, Sleemi A, Pikiş A, Patel KM, Campos JM: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization in children. J Clin Microbiol 1999, 37: 413-416.
6. Vural T, Şekercioğlu AO, Öğünç D ve ark: Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. ANKEM Derg 1999, 13: 1-4.
7. Leclercq R: Enterococci acquire new kinds of resistance. Clin Infect Dis 1997, 24 (Suppl 1): S80-S84.
8. Korten V, Murray BE: Enterococcus, pp: 93-107. In: Emmerson AM, Hawkey PM, Gillespie SH (Eds), Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 1997, John Willey and Sons Ltd, Chichester.
9. Leclercq R, Courvalin P: Resistance to glycopeptides in enterococci. Clin Infect Dis 1997, 24: 545-554.
10. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P: VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. Antimicrob Agents Chemother 1999, 43: 2161-2164.
11. Chow JW, Kuritza A, Shlaes DM, Green M, Sahm DF, Zervos MJ: Clonal spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* between patients in three hospitals in two states. J Clin Microbiol 1993, 31: 1609-1611.
12. Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, Tenover FC: Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S hospitals. Antimicrob Agents Chemother 1993, 37: 2311-2317.
13. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol 1995, 33: 1434.

14. Bell JM, Paton JC, Turnidge J: Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: Phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbiol* 1998, 36: 2187-2190.
15. Barry T, Glennon CM, Dunican LK, Gannon F: The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* 1991, 1: 149.
16. Jensen MA, Webster JA, Straus N: Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* 1993, 59: 945-952.
17. Tyrrell GJ, Bethune RN, Willey B, Low DE: Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 1054-1060.
18. Kohner PC, Patel R, Uhl JR, et al: Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk diffusion, and automated Vitek methods for testing susceptibilities of *Enterococcus spp.* to vancomycin. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 3258-3263.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A4. 1997, NCCLS, Wayne, PA.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A2. 1991, NCCLS, Wayne, PA.
21. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 24-27.
22. Schito GC: Focus on glycopeptides. 8th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. May 25-28, 1997. Lausanne, Switzerland.
23. Bascomb S, Manafi M: Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram positive cocci. *Clin Microbiol Rev* 1998, 11: 318-340.
24. Edmond M, Sahm DF: *E.faecium*, not *E.faecalis*, is the culprit in vancomycin resistance. *Mo Med* 1998, 66: 51.
25. Nelson RR, McGregor KF, Brown AR, Amyes SG, Young H: Isolation and characterization of glycopeptide-resistant enterococci from hospitalized patients over a 30-month period. *J Clin Microbiol* 2000, 38: 2112-2116.
26. Descheemaeker P, Lammens C, Pot B, Vandamme P, Goossens H: Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *Int J Syst Bacteriol* 1997, 47: 555-561.
27. Snell JJ, Brown DF, Perry SF, George R: Antimicrobial susceptibility testing of enterococci: Results of a survey conducted by the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Microbiology. *J Antimicrob Chemother* 1993, 32: 401-411.
28. Brown DF, Courvalin P: Quality assessment of glycopeptide susceptibility tests: A European collaborative study. European Glycopeptide Resistance Group. *Int J Antimicrob Agents* 1997, 9: 153-163.
29. Jacoby GA: Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. *Ann Rev Med* 1996, 47: 169-179.
30. Bager F, Madsen M, Christensen J, Aarestrup FM: Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med* 1997, 31: 95-112.
31. Simonsen GS, Haaheim H, Dahl KH, et al: Transmission of VanA-type vancomycin-resistant enterococci and vanA resistance elements between chicken and humans at avoparcin-exposed farms. *Microb Drug Resist* 1998, 4: 313-318.

32. Endtz HP, van den Braak N, van Belkum A, et al: Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 3026-3031.
33. Landman D, Quale JM: Management of infections due to resistant enterococci: A review of therapeutic options. *J Antimicrob Chemother* 1997, 40: 161-170.
34. Yüce A, Karaman M, Gülay Z, Yuluğ N: Yenidoğanlarda vankomisine dirençli enterokokların fekal taşıyıcılığı. *ANKEM Derg* 1999, 13: 7-11.
35. Toye B, Shymanski J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K: Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the vanC genotype). *J Clin Microbiol* 1997, 35: 3166-3170.