TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CLOSTRIDIUM DIFFICILE TOKSİNİ ARAŞTIRILMASI İSTEĞİ İLE GÖNDERİLEN DIŞKI ÖRNEKLERİNDEKİ VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOK (VRE) KOLONİZASYONUNUN SAPTANMASI

SEVİM ÖZSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Zeynep Arzu İLKİ

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans

Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Sahibi : Sevim ÖZSOY

Tez Başlığı : *Clostridium difficile* Toksini Araştırılması İsteği İle Gönderilen Dışkı Örneklerindeki Vankomisin Dirençli Enterokok (VRE) Kolonizasyonunun Saptanması

Sınav Yeri : Tıbbi Mikrobiyoloji

Sınav Tarihi : 01.10.2014

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Doç. Dr. Z. Arzu İLKİ	M.Ü.Tıp Fak.	

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. M.Ufuk HASDEMİR	M.Ü. Tıp Fak.	
Yrd. Doç. Dr. Onur KARATUNA	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 05../11../2014 tarih ve 35 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

F. Arıcıoğlu.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim

BEYAN

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

Sevim ÖZSOY

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren her aşamada bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her konuda yardım ve hoşgörüsü ile bana destek olan, güvenini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, iyi bir eğitimci ve araştırıcı olmanın en güzel örneğini teşkil ederek kendisinden öğrenebilmemi sağlayan değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Zeynep Arzu İLKİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince bana zamanlarını ayıran ve her zaman gülümseyerek bana moral veren, verdikleri eğitimle başarılı olmam için bakış açımı değiştiren ve pozitif düşünme yollarını gösteren iyi bir araştırıcı olmak için örnek aldığım değerli hocalarım Prof. Dr. Güner SÖYLETİR, Prof. Dr. Ufuk HASDEMİR, Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN, Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU, Prof. Dr. Nurver ÜLGER ve Dr. Burak AKSU'ya en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren benimle güzel dostluklarını paylaşan sevgili yüksek lisans, doktora, asistan ve laboratuvardaki tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm yaşamım boyunca her zaman yanımda olan, her zor anımda beni cesaretlendiren en büyük desteğim, başarım için maddi ve manevi hiçbir şeyi esirgemeyen, her konuda sonsuz özverisiyle beni minnettar kılan canım anneme ve tüm aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Son olarak da artık yanımda olamasa da sevgisini her zaman kalbimde hissettiğim babama çok teşekkür ederim.

Sevim ÖZSOY

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i
İÇİNDEKİLER ii
KISALTMALAR ve SİMGELER: v
ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ vi
ÖZET 1
ABSTRACT 2
1. GİRİŞ 3
2.1. *Clostridium difficile* 5
2.1.1.Tarihçe 5
2.1.2. Mikrobiyolojik özellikleri 6
2.1.3. Patogenez 7
2.1.4. Risk faktörleri 7
2.1.5. Tedavi 7
2.2. Enterokoklar 8
2.2.1.Tarihçe 8
2.2.2. Mikrobiyolojik Özellikler 9
2.2.2.1. Görünüm ve Boyanma Özellikleri 9
2.2.3. Sınıflandırma 11
2.2.4. Enterokokların İzolasyonu ve Tanımlanması 12
2.2.4.1. Ticari sistemlerle tanımlama 13
2.2.4.2. Moleküler yöntemlerle tanımlama 13
2.2.5. Epidemiyoloji 14
2.2.6.Virulans faktörleri 15
2.2.6.1. Hemolizin ve sitolizin 15
2.2.6.2. Jelatinaz 15
2.2.6.3. Enterokokal yüzey proteini 15
2.2.6.4. Agregasyon Faktörü 16
2.2.6.5. Lipoteikoik Asit 16
2.2.6.6. Süperoksit 16
2.2.6.7. Seks feromonları 16
2.2.6.8. Hyaluronidaz 17
2.2.6.9. Kapsül, polisakkaritler ve hücre duvarı 17

2.2.7. Enterokokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar 17
2.2.7.1. Üriner sistem enfeksiyonları 18
2.2.7.2. Bakteriyemi 18
2.2.7.3. Endokardit 18
2.2.7.4. Karın içi ve pelvik enfeksiyonlar 18
2.2.7.5. Yara ve yumuşak doku enfeksiyonları 19
2.2.7.6. Menenjit 19
2.2.7.7. Solunum yolu enfeksiyonları 19
2.2.7.8. Pediyatrik enfeksiyonlar 19
2.2.8. VRE Kolonizasyonunun ve Enfeksiyonunun Önemi 19
2.2.10. Doğal Direnç 21
2.2.11. Beta laktam direnci 21
2.2.9.2. Kazanılmış (Estrensek) direnç 22
2.2.11. Yüksek Düzeyde Aminoglikozid Direnci 22
2.2.12. Vankomisin Direnci 23
2.2.13. VRE enfekiyonu/kolonizasyonu için risk faktörleri 25
2.2.13.1. Hastaya ait faktörler: 25
2.2.13.2. Hastaneye Ait Faktörler: 25
2.2.14. VRE'den Korunma ve Kontrol Önlemleri 26
2.2.15.1. Uygun vankomisin kullanımı 26
Vankomisin kullanımından kaçınılması gereken durumlar 27
2.2.15.2. Hastane Personelinin Eğitimi 28
2.2.15.3. Mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı 28
2.2.16. Enterokok Enfeksiyonlarında Tedavi 29
2.2.17. Gastrointestinal Kolonizasyonun Eradikasyonu 29
3. GEREÇ VE YÖNTEM 30
3.1. Gereçler 30
3.1.1. Çalışmaya Alınan Örnekler 30
3.1.2. Çalışma Grubunu Oluşturan Örneklerin Belirlenmesi 30
3.1.3. Besiyerleri 30
3.1.4. Kimyasal Maddeler 30
3.1.5. Kullanılan cihazlar 31
3.2. Yöntemler 32
3.2.1. Dışkı Örneklerinde *C. difficile* Toksin Varlığının Saptanması 32

3.2.1.1. Toksin Yöntemi 32
3.2.1.2. Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi 32
3.2.2. Örneklerin Ekimi 32
3.2.3.Tanımlamada Kullanılan Test ve Yöntemler 33
3.2.3.1. Katalaz testi 33
3.2.3.2. Tuz tolerans testi 33
3.2.3.3. PYR testi 33
3.2.4. Enterokokların Tür Tayini 34
3.2.5. Gradiyent Strip Yöntemi ile Vankomisin ve Teikoplanin MİK Değerlerinin Belirlenmesi 34
3.2.6. Suşların Saklanması 35
3.2.7. Direnç Genlerinin PZR ile Belirlenmesi 36
3.2.8. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi 37
3.2.8.1. Agaroz jelin hazırlanması 37
3.2.8.2. *vanA ve vanB* Gen Bölgelerinin Tespiti 38
3.2.9. İstatistiksel Analiz 38
4. BULGULAR 39
4.1. Dışkı Örneklerinin Değerlendirilmesi 40
4.2. Enterokokların Tür Tayini Sonuçları 41
4.3. Enterokokların Servislere Göre Dağılımı 42
4.4. Pediyatri ve Dahiliye Servisinden Gelen Örneklerin Değerlendirmesi 43
4.5. Enterokokların Vankomisin ve Teikoplanin Duyarlılıklarının Tespiti 44
4.6. Enterokokların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları 44
4.7. PZR Sonuçları 47
4.8. Enterokokların Gradiyent Strip ve PZR Sonuçlarının Karşılaştırılması 48
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 49
6. KAYNAKLAR 53
EKLER 62
Ek 1. Etik Kurul Onayı 62

KISALTMALAR ve SİMGELER:

- VRE: Vankomisine Dirençli Enterokoklar
- PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- PÖD: Pozitif Öngörü Değeri
- NÖD: Negatif Öngörü Değeri
- *PMC:* Pseudomembranöz enterokolit
- GİS: Gastrointestinal Sistem
- ATCC: American Type Culture Collection
- MİK: Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
- CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute
- NaCl: Sodyum Klorür
- PYR: Pyrolidonyl Naphthylamid
- BKİA: Beyin Kalp İnfüzyon Agar
- BKİB: Beyin Kalp İnfüzyon Broth
- CCFA: Cycloserine-Cefoxitine-Fruktose Agar
- TBE: Tris borik asit-EDTA
- NNNIS: National Nosocomial Infections Surveillance System
- TNF: Tumor Necrosis Factor
- IFN: Interferon
- TMP-SMX: Trimetoprima-sulfametoxazol
- HICPAC: Hospital Infection Control Practices Advisory Committee
- CDC: Centers Disease Control
- TBE-EDTA: Tris-Borik Asit-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. Şekillerin Listesi

Şekil 1: Enterokokların Gram Boyama Görüntüsü…….…..10

Şekil 2: Enterokokların Tür Dağılımı…….……...41

Şekil 3: Enterokokların Servislere Göre Dağılımı……41

ii. Resimlerin Listesi

Resim 1: chromID VRE Görüntüsü……..39

Resim 2: Koyun Kanlı Agarda Enterokok Görüntüsü…….…..40

Resim 3: İzole edilen mikroorganizmanın biyokimyasallara etkisinin API20 STREP ile değerlendirilmesi (çalışmamızdan)……...….40

Resim 4: Gradiyent Strip Vankomisin/Teikoplanin Duyarlılık Testi Görüntüsü…….……..…….....45

Resim 5: *vanA* pozitif VRE Kökenlerinin Jel Elektroforez Görüntüsü…….....….45

iii. Tabloların Listesi

Tablo 1. Enterokok Cinsi İçinde Yer Alan Türler……..……9

Tablo 2. Enterokokların İdentifikasyonu…….12

Tablo 3. Toksin Sonuçlarının Değerlendirilmesi……..32

Tablo 4. *vanA, vanB* Gen Bölgelerinin PZR Reaksiyon Karışımı…….....36

Tablo 5. Vankomisin Direncinden Sorumlu *vanA* ve *vanB* Direnç Genlerinin Amplifikasyonunda Kullanılan PZR Koşulları ……37

Tablo 6. Çalışmaya Alınan Örneklerin Servis Dağılımı……...38

Tablo 7. Toksin Pozitif Hastaların Servis Dağılımı……..……....38

Tablo 8. Toksin Negatif Hastaların Servis Dağılımı…….39

Tablo9. Pediyatri Servisinden Gelen Örneklerde Enterokok Oranı…….…….……....42

Tablo10. Dahiliye Servisinden Gelen Örneklerde Enterokok Oranı……..……42

Tablo 11. *C.difficile* Toksin Varlığı ve VRE Kolonizasyonu ……..……..……...……..43

Tablo 12. VRE Olarak Saptanan Kökenlerin Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları……..…44

ÖZET

Clostridium difficile Toksini İsteği İle Gönderilen Dışkı Örneklerindeki Vankomisin Dirençli Enterokok (VRE) Kolonizasyonunun Saptanması

Sevim ÖZSOY, Arzu İLKİ, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Amaç:

C. difficile ve VRE uygunsuz antibiyotik kullanımıyla ilişkili en önemli nozokomiyal patojenlerdir. VRE kolonizasyonu özellikle hastanede yatan, immun yetmezlikli, kemoterapi alan hastalarda VRE enfeksiyonu oluşturma açısından önemli risk faktörüdür. Benzer risk faktörleri *C. difficile* için de önem taşımaktadır. Bu çalışmada, amaç hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına rutin *C. difficile* toksini bakılması isteği ile gönderilen dışkılardaki VRE kolonizasyonunun belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntem:

Toksin bakılması isteği ile gönderilen 158 dışkı örneğiyle çalışılmıştır. Çeşitli fenotipik ve biyokimyasal tanımlama işlemlerinden sonra 19 VRE izolatı saptanmıştır. Vankomisin ve teikoplanin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) E-test ile belirlenmiş ve direnç genleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır.

Bulgular:

Toksin pozitif örneklerin (n:88) %17'sinde VRE pozitifliği saptanırken, toksin negatiflerde bu oran %5.7 olarak bulunmuştur. VRE'lerin tümü *E.faecium* olarak tanımlanmıştır. Toksin pozitifliğinin VRE kolonizasyonu açısından pozitif öngörü değeri (PÖD) %79, negatif öngörü değeri (NÖD) %47 olarak saptanmıştır.

Sonuçlar:

Elde ettiğimiz sonuçlara göre *C. difficile* toksin pozitif hasta örneklerindeki VRE kolonizasyonunun negatiflere göre anlamlı olarak ($p<0.05$) daha yüksek olduğu görülmüştür. VRE taraması hastaneler için ciddi bir maliyet yükü getirmektedir. Bu sebeple günümüzde bu taramalarda hastaların seçilerek özellikle hematoloji-onkoloji gibi servislerle sınırlandırılmasının maliyet etkinlik açısından gerekliliği tartışılmaktadır. Çalışmamızda elde ettğimiz %79 PÖD, VRE taraması için hasta seçiminde *C. difficile* toksin pozitif hastaların taranmasının anlamlı olacağını göstermektedir. Bu durum hastaneler açısından hem iş gücü, hem de maliyet kazancına yol açacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium difficile*, enterokok, vankomisin direnci, kolonizasyon

ABSTRACT

Determining the Vancomycin Resistant Enterococcus (VRE) colony from the faecal samples which have been sent to obtain the toxins of *Clostridium difficile*.

Sevim ÖZSOY, Arzu İLKİ, Department of Medical Microbiology

Aim:

C. difficile and VRE are the most important nosocomial pathogens which are related to the misuse of antibiotics. VRE colonization is the main cause for diarrhoea in patients with immune deficiency, hospitalized or undergoing chemotherapy. Similar factors for C. difficile is also important. In this study our aim was to determine the VRE colonization from the faecal samples sent to obtain the toxins of *C. difficile*.

Methods: 158 faecal samples tested for *C. difficile* toxins. After various phenotypic and biochemical identification procedures were applied, 19 VRE were isolated. The minimum inhibiting concentrations (MIC) of vancomycin and teicoplanin were determined by E-test and their resistant genes were studied by Polymerase Chain Reaction (PCR) method.

Results: VRE positivity was 17% in toxin positive samples, however it was 5.7% in negative ones. All of the VRE were identified as *E.faecium*. While the positive predictive value (PPV) of VRE colonization in toxin positives is 79%, the negative predictive value (NPV) is 47%.

Conclusion: According to the results of our study, the rate of VRE colonization in toxin positive samples is significantly higher ($P<0.05$) than the negative ones. Screening of VRE cause a high cost for hospitals. Theese screening can be limited to special ward like hematology-oncology to reduce the cost for hospitals. Our results show that screening VRE in *C. difficile* toxin positive sample are remarkable. This will help the hospitals to reduce workload and cost.

Keywords: *Clostridium difficile*, enterococcus, vancomycin resistance, colonization

1. GİRİŞ

Antibiyotik kullanımı sırasında veya sonrasında gelişen ve başka bir nedenle açıklanamayan ishaller genel olarak antibiyotikle ilişkili ishal olarak adlandırılır (43). *C. difficile*, antibiyotikle ilişkili ishallerin en iyi bilinen etkeni olup antibiyotik kullanımı sonrası görülen ishallerin %15-20'sinden sorumludur (10, 44).

Antibiyotik kullanımı, barsak florasını baskılayarak, *C. difficile* aşırı üremesine yol açmaktadır. Hastane ortamı *C. difficile* bakteri ve sporları için kaynak teşkil ederler. Hastanede kalma süresi ile enfeksiyon riski doğru orantılı olarak artmaktadır. Diğer risk faktörleri arasında, başta kemoterapi alan kanser hastaları olmak üzere, altta yatan hastalık, ileri yaş, yoğun bakımda yatma gibi faktörler gelmektedir. Ayrıca değişik çalışmalarda gösterilen risk faktörleri arasında; yoğun bakımda yatma, laksatif kullanımı, anti-ülser ilaç kullanımı, uzun süreli hastanede yatma, lavman yapılması, gastrointestinal invaziv işlemler, gastrointestinal cerrahi ve enteral beslenme sayılabilir (8, 14, 51).

Aynı risk faktörleri, barsak florasında VRE kolonizasyonu açısından da önemlidir. Gastrointestinal sistem her iki bakteri içinde önemli bir kaynaktır. Özellikle VRE oranları son yıllarda hastanelerde giderek arttığı için belirlenmesi yayılımın önlenmesi açısından önemlidir (2).

VRE'nin kısa sürede belirlenebilmesi için tanımlama işlemlerinin en kısa sürede gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kullanılacak besiyerinin, ticari sistemin veya moleküler yöntemin hem hızlı sonuç veren hem de güvenilir olması önemlidir. Günümüzde enterokokların tür düzeyinde tanımlamaları morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler aracılığıyla yapılmaktadır (42).

Son yıllarda, bunlara ilave olarak; enterokokların cins, tür hatta antibiyotik direncini de aynı anda saptayan ayrıca özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek kromojenik besiyerleri tanımlamada önemli bir yer oluşturmaya başlamıştır (33).

Moleküler yöntemler; hızlı sonuç veren, fakat özel laboratuvar koşulları gerektiren ve maliyeti yüksek testler oldukları için rutinde kullanımları kısıtlıdır. Ancak araştırma amaçlı yapılan çalışmalarda özellikle PZR yöntemi sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir.

C. difficile ve VRE benzer risk faktörlerine sahip önemli nozokomiyal patojenlerdir. Toksin pozitifliği yüksek olan bazı bölümlerde VRE kolonizasyonunun da birlikte saptanması odağa yönelik taramalar açısından önem taşımaktadır. Amacımız Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na *C. difficile* toksini araştırılması isteği ile gönderilen dışkı örneklerindeki VRE kolonizasyonunun kromojenik besiyeri gibi çeşitli fenotipik yöntemlerle kısa sürede saptanmasıyla VRE taramalarının özellikle benzer risk faktörleri gösteren *C.difficile* toksin pozitifliği olan kişiler ve bazı bölümlerle sınırlandırılarak gereksiz iş yükü ve maliyetin önüne geçilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Clostridium difficile*

2.1.1.Tarihçe

Antibiyotik kullanımı sırasında veya sonrasında gelişen ve başka bir nedenle açıklanamayan ishaller antibiyotikle ilişkili ishal olarak tanımlanır (43). Antibiyotik kullanımı sonrası görülen ishallerin %15-20'sinden sorumlu olan *C. difficile*, pseudomembranöz enterokolit (PMC) dahil olmak üzere antibiyotikle ilişkili kolit olgularının en iyi bilinen etkenidir (9).

PMC ilk kez Finney tarafından 1893 yılında tanımlanmıştır. Mide tümörü nedeniyle ameliyat edilen bir kadın hastada, operasyonunun ardından ishal başlamış; hasta 15 gün sonra kaybedilmiş, yapılan otopside, ince bağırsaklarda psödomembranlar görülmüştür (42). Bakteri ise ilk defa 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından, yenidoğan ve 1 yaşın altındaki semptomsuz çocukların dışkılarından izole edilmiştir. Üremenin yavaş olması ve izolasyonunun zorluğu nedeniyle "difficult" (güç, zor) kelimesinden esinlenerek "*Bacillus difficilis*" olarak tanımlanmıştır ancak uzun yıllar bu bakterinin herhangi bir patolojiye yol açabildiği tespit edilmemiştir (16). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bazı *C. difficile* kökenlerine ait kültür filtratlarının, deney hayvanlarına subkutenöz veya intraabdominal yolla verildiğinde, toksik etki oluşturulduğu ve ölüme yol açtığı görülmüştür (89).

1960 yılına kadar *C. difficile* ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmamıştır. 1960'da McBee *C. difficile*'yi Antartika'da ayı balıklarının bağırsaklarından izole etmiştir (72). Sonraki yıllarda, antimikrobiyal kemoterapide klindamisin ve linkomisin'in fazla kullanılmasıyla PMC'nin görülme oranında artış gözlemlenmiştir. Tedesco ve arkadaşları 200 hastanın klindamisin kullanımından sonra %20'sinde ishal, %10'unda PMC saptamış, bu hastaların dışkı kültürlerinde *C. difficile*'yi üreterek izole etmiştir. Böylece klindamisin kullanımı ile PMC arasında bağlantı kurulmuştur (97). Larson ve arkadaşları antibiyotik kullanımına bağlı gelişen PMC'ye bir toksinin neden olduğunu öne sürmüşlerdir. PMC-*C. difficile* arasındaki ilişki kesin olarak 1978 yılında Barlett tarafından saptanmıştır (92). O zamandan bu yana *C. difficile* hafif diyareden, pseudomembranöz enterokolite kadar değişen hastalıklara neden olan bir bakteri olarak tanımlanmıştır. Ancak klinik önemi 1970'li yılların ortalarına kadar anlaşılamamıştır (81).

2.1.2. Mikrobiyolojik özellikleri

C. difficile 0.5-2 µm eninde, 3-17 µm boyunda, subterminal oval sporlu, hareketli, kapsüllü, ince, uzun, zorunlu anaerop bir çomaktır. Geniş, oval, subterminal nadiren terminal yerleşimli spora sahiptir. Sporların bakteri hücre kalınlığından daha geniş olması, bakteriye mekik, raket ve davul tokmağı görünümü kazandırır. Genç kültürlerde daima gram pozitif boyanmakta iken, eski kültürlerde ise gram negatif boyanma eğilimi göstermektedir (12, 65, 110).

C. difficile adi besiyerlerinde üreyebilir, ancak içinde kan, fruktoz ve yumurta bulunan besiyerlerinde daha kolay ürer. Üreyebilmesi için %10 karbondioksit, %10 hidrojen ve %80 nitrojen bulunan ortama ihtiyaç gösteren bir anaeroptur. Optimum üreme ısısı 30-37°C olmasına rağmen 20-45°C'ler arasında da üreyebilir (65). Bakteri çoğu antibiyotiğe dirençli olduğu için dışkı gibi örneklerden ilk izolasyonunda seçici besiyerleri kullanılır. Bu amaçla en fazla kullanılan seçici besiyeri Cycloserine-Cefoxitin-Fructose Agar (CCFA)' dır. Bu besiyeri diğer bakterilerin baskılanmasına neden olabilecek sikloserin (500 µg/ml) ve sefoksitin (16 µg/ml) gibi antimikrobiyaller ve fruktoz içermektedir. CCFA'ya ekilen örnekler anaerop ortamda 48 saat inkübe edildikten sonra, 2-3 mm çapında, ortası biraz kabarık, buzlu cam görünümünde, kenarları hafif filamentöz koloniler oluşabilmektedir (93). Bakteri kanlı agarda spor oluştururken CCFA'da spor oluşumu gözlenmez. Örneklerin 80°C'de 10 dakika bekletilmesiyle ya da saf alkol ile işlemden geçirilerek sporların seçilmesiyle kültürde üretme şansı yükseltilebilir. Ayrıca hastane salgınlarında hızlı tanımlamada glutamat dehidrogenaz prolin amino peptidaz testleri tercih edilebilecek testlerdir. (4). *C. difficile* glikoz, salisilin, mellibioz, melesitoz ve mannitolü asit oluşturarak fermente ederken, çoğu suşun maltoz, laktoz, sükroz, galaktoz, ksiloz, gliserol, arabinoz, rafinoz ve ramnoza etkisi yoktur. Jelatin ve eskülini hidrolize eder. Proteolitik değildir, lesitinaz, üreaz ve lipaz aktivitesi yoktur. H_2S ve triptofandan indol üretmez. Diğer yandan *C. difficile*, p-hidroksifenilasetik asitten p-krezol açığa çıkararak, karakteristik özelliği olan at pisliği kokusunu ortaya çıkarmaktadır (20).

2.1.3. Patogenez

C. difficile'nin hastalık oluşturabilmesi için kolon florasının antibiyotiklerle baskılanması gerekir. Hastalık iki önemli toksin aracılığı ile gelişmektedir. Toksin üreten türleri patojeniktir, bakteri miktarının artmasıyla toksin miktarı da artar. *C. difficile* toksin A ve toksin B denilen toksinler ve son yıllarda varlığı kanıtlanan "*binary*" toksin üretmektedir (80). Hastalığı bu toksinler yapmaktadır. Toksin A 308 kDa molekül ağırlığında bir enterotoksin, toksin B ise 270 kDa ağırlığında bir sitotoksindir. Toksin A'nında sitotoksik özelliğe sahip olmasına rağmen, toksin B'nin sitotoksin özelliği 100 ile 1000 kat daha fazla bulunmuştur. Her 2 toksinin de etki mekanizması benzerlik göstermektedir. Toksinler protein yapısında olup asitlere, ıssıya ve proteolitik enzimlere duyarlıdır. Kemotripsin ve tripsinle inaktive olur (22, 34, 100, 104).

2.1.4. Risk faktörleri

C. difficile'ye bağlı ishal gelişiminde rol oynayan risk faktörleri; ileri yaş, altta yatan hastalıklar, endoskopi, nazogastrik tüpün varlığı, yoğun bakımda yatma, uzun süreli hastanede yatış, antiülser ilaç kullanımı, antibiyotik ve çoklu antibiyotik tedavisi olarak gösterilmiştir (8). Bu nedenle tedavide seçilecek antibiyotik hem enfeksiyonun önlenmesi hem de florada bulunan diğer bakterilerin kolonizasyonuna etki etmesi nedeniyle dikkat edilmelidir.

2.1.5. Tedavi

C. difficile'ye bağlı ishal tedavisinde antibiyotik tedavisinin kesilmesi ilk adımdır. Antibiyotiğin devamı kesin olarak gerekli ise düşük riskli antibiyotiklerin kullanılması gerekir. Hafif olgularda ciddi tedavi gerektirmeden sıvı ve elektrolit replasmanı yeterli olur. Ancak ağır olgularda tedavi gerekir. Tedavi için ilk seçenek metronidazoldür (oral, 4x250 mg/gün). Metronidazol tedavisine cevap vermeyen hastalarda ikinci seçenek vankomisindir (oral, 4x250 mg/gün). Genellikle bu antibiyotiklerle tedavi sağlanmaktadır. Ancak vankomisin kullanımı özellikle hastane kaynaklı vakalarda normal florada bulunan enterokoklara etki ederek vankomisin direncini potansiyel olarak indükleme riski nedeni ile tercihinde şüphe taşımaktadır (28).

C. difficile enfeksiyonunun tedavisinde vankomisin kullanımıyla ilgili dünyada yapılmış bazı çalışmalar mevcuttur. Rafferty ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada *C. difficile* toksin A pozitif ve toksin negatif örneklerdeki VRE kolonizasyonu kıyaslanmış ve 3 aylık zaman diliminde gelen 79 örnekten %16.5 oranında VRE pozitifliği saptanmıştır (82). Leber ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da *C. difficile* toksin isteği ile gelen 50 dışkı örneğini incelemeye almışlar ve bu örneklerdeki VRE kolonizasyon oranını %3.2 olarak bulmuşlardır (70). Diğer çalışmalarda birbirine benzer sonuçlar elde edilmesine karşın Fujitani ve arkadaşlarının çalışmasında ise VRE kolonizasyon oranı % 55.7 olarak saptanmıştır (47). VRE kolonizasyonuna son yıllarda hastanelerde sıklıkla rastlanması ve nozokomiyal VRE enfeksiyonlarının önemi sebebiyle, bu kolonizasyonunun tedavi başlamadan önceki en kısa sürede belirlenmesi önem kazanmıştır.

2.2. Enterokoklar

2.2.1.Tarihçe

Enterokok terimi ilk kez 1899 yılında Thircelin tarafından Fransa'da yayınlanan bir makalede "insan dışkısında kısa zincirler veya çiftler halinde görülen bakteriler" olarak tanımlanmıştır (42). 1906 yılında T. J. Horder endokarditli bir hastanın kanından izole edilen mikroorganizmaya *S. faecalis* adı verilmiştir. 1919 yılında ise Orla-Jensen *S.faecalis*'ten farklı fermentasyon özelliklerine sahip *S.faecium* denilen ikinci bir grup tanımlanmıştır (62). 1930'larda Lancefield tarafından yapılan sınıflandırmada enterokoklar, Grup D streptokoklar içinde tanımlanmış ve uzun bir süre streptokok cinsi içinde yer almıştır (42). 1937 ve 1938 yıllarında J. M. Sherman 9.6 pH'da, 10-45°C arasındaki sıcaklıklarda ve %6.5 NaCl içeren sıvı besiyerinde üreyebilen ve 60°C' de 30 dakika canlı kalabilen streptokoklar için "enterokok grubu" terimini kullanmıştır (52). Enterokokların streptokoklardan kesin olarak ayrımı 1984 yılında K. H. Schleifer ve R. Klipper-Batz tarafından yapılmıştır. *S. faecalis* ve *S. faecium* türlerinin diğer streptokoklardan farklı özelliklere sahip olduklarını ileri sürerek *Streptococcus spp.* cinsinden ayrılıp *Enterococcus spp.* adı verilen bir cins olarak tanımlanması gerektiğini söylemişlerdir (Tablo 1). Daha sonraki çalışmalarda da 16S rRNA dizi analizi ve total hücre protein profil analizi gibi yöntemlerle enterokokların yeni bir cins oldukları gösterilmiştir (102, 109).

Tablo 1. Enterokok cinsi içinde yer alan türler

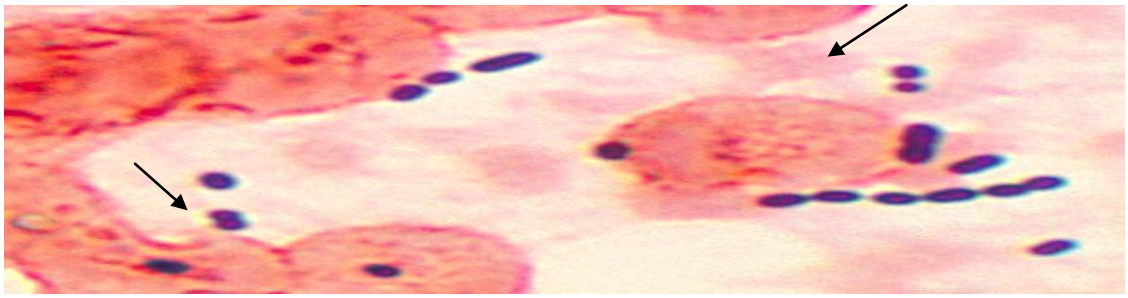
Enterokok cinsi içinde yer alan türler		
Enterococcus aquimarinus	*Enterococcus faecalis*	*Enterococcus pallens*
Enterococcus asini	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus phoeniculicola*
Enterococcus avium	*Enterococcus gallinorum*	*Enterococcus pseudoavium*
Enterococcus caccae	*Enterococcus gilvus*	*Enterococcus raffinosus*
Enterococcus canintestini	*Enterococcus haemoperoxidus*	*Enterococcus ratti*
Enterococcus canis	*Enterococcus hermanniensis*	*Enterococcus saccharolyticus*
Enterococcus casseliflavus	*Enterococcus hirae*	*Enterococcus silesiacus*
Enterococcus cecorum	*Enterococcus italicus*	*Enterococcus sulfureus*
Enterococcus columbae	*Enterococcus malodoratus*	*Enterococcus termitis*
Enterococcus devriesei	*Enterococcus moraviensis*	*Enterococcus thailandicus*
Enterococcus dispar	*Enterococcus mundtii*	*Enterococcus villorum*
Enterococcus durans		

2.2.2. Mikrobiyolojik Özellikler

Enterokoklar insanların ve sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistem (GİS) florasında, böceklerde, bitkilerde, dışkı ile kirlenmiş toprak, su ve yiyeceklerde bulunur. Bazen de ağız ve derilerin de (özellikle perianal deri) ve normal florada bulunur. Enterokoklar laktik asit üretmelerinden dolayı peynir yapımında da kullanılır. Ayrıca et ürünleri ve diğer yiyeceklerden de izole edilebilir (15, 21, 42). İnsan dışkısında *E. faecalis* (10^5-10^7 cfu/gr), *E. faecium*'dan (10^4-10^5 cfu/gr) daha sıklıkla bulunur, ancak hastane ortamında *E. faecium* daha sık görülür (45, 57).

2.2.2.1. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

Enterokoklar gram pozitif boyanan, tekli, ikili ya da kısa zincirli, fakültatif anaerop, katalaz negatif koklardır (73). Yuvarlak, oval ya da kokobasil şeklindeki bu bakteriler tek tek, diplokok ya da kısa zincirler şeklinde görülürler (Şekil 1).



Şekil 1: Enterokokların Gram Boyama Görüntüsü (55).

Dış ortam şartlarına, fiziksel ve kimyasal etkenlere dayanıklı bakterilerdir. Birçok türü 10°C ile 45°C arasında üreyebilir. Ancak ideal üreme sıcaklıkları 35°C'dir. 30 dakikaya kadar 60°C'de yaşayabilirler. L-pirolidonil-β-naftilamidi (PYR) hidroliz ederler. *E. gallinorum* ve *E. caselliflavus* hariç hareketsizdirler (42). Karbonhidrat metabolizması açısından fermentatif mikroorganizmalardır. Glikoz fermentasyonu sonucu son ürün olarak laktik asit oluştururlar ancak gaz oluşturmazlar. Glikozdan gaz oluşturmamalarıyla *Leuconostoc* cinsi bakterilerden ayrılırlar (100). Besiyerine yeşil renk veren alfa toksin üretimi değil, eritrositlerdeki peroksitin etkisidir (9, 11, 61). pH 9,6'da, %6,5'lik NaCl'li besiyerinde ve %40 safra tuzu içeren besiyerinde üreyebilir ve eskülini hidrolize ederler (Safra eskülinli besiyerinde meydana gelen renk değişikliği ile eskülin hidrolizi gözlenebilir). Tüm kökenlerde lösin aminopeptidaz (LAPase) aktivitesi görülür (109). Enterokokların hücre duvarı teikoik asit, peptidoglikan (%40'ı) ve polisakkaritlerden oluşur. Lancefield' in Grup D antijeni, teikoik asitten oluşur. Çoğu enterokok suşu Grup D antiserumu (%80 oranında), bazıları Grup Q antiserumu ile reaksiyon verir (31, 98). *E. faecalis* türlerinin bir kısmı at, tavşan, ya da insan kanlı agarda hemoliz yapabilirken, koyun kanlı agarda hemoliz yapmazlar. Diğer enterokok türleri ise ya hiç hemoliz yapmaz ya da alfa hemoliz yaparlar. Alfa hemoliz yapanlar peroksit üreten nonhemolitik türlerdir (16).

2.2.3. Sınıflandırma

Enterokoklar mannitol, sorbitol ve sorboz içeren besiyerlerinde asit oluşturmalarına ve arginini hidrolize etmelerine göre beş gruba ayrılırlar (Tablo 2) (42).

Grup 1: Mannitol, sorbitol ve sorboz sıvı besiyerinde asit oluşturur, fakat arginini hidrolize etmezler. *E. avium, E. malodoratus, E. raffinosus, E. pseudoavium, E. sacchorolyticusi E. pallens, E. gilvus* bu gruptadır.

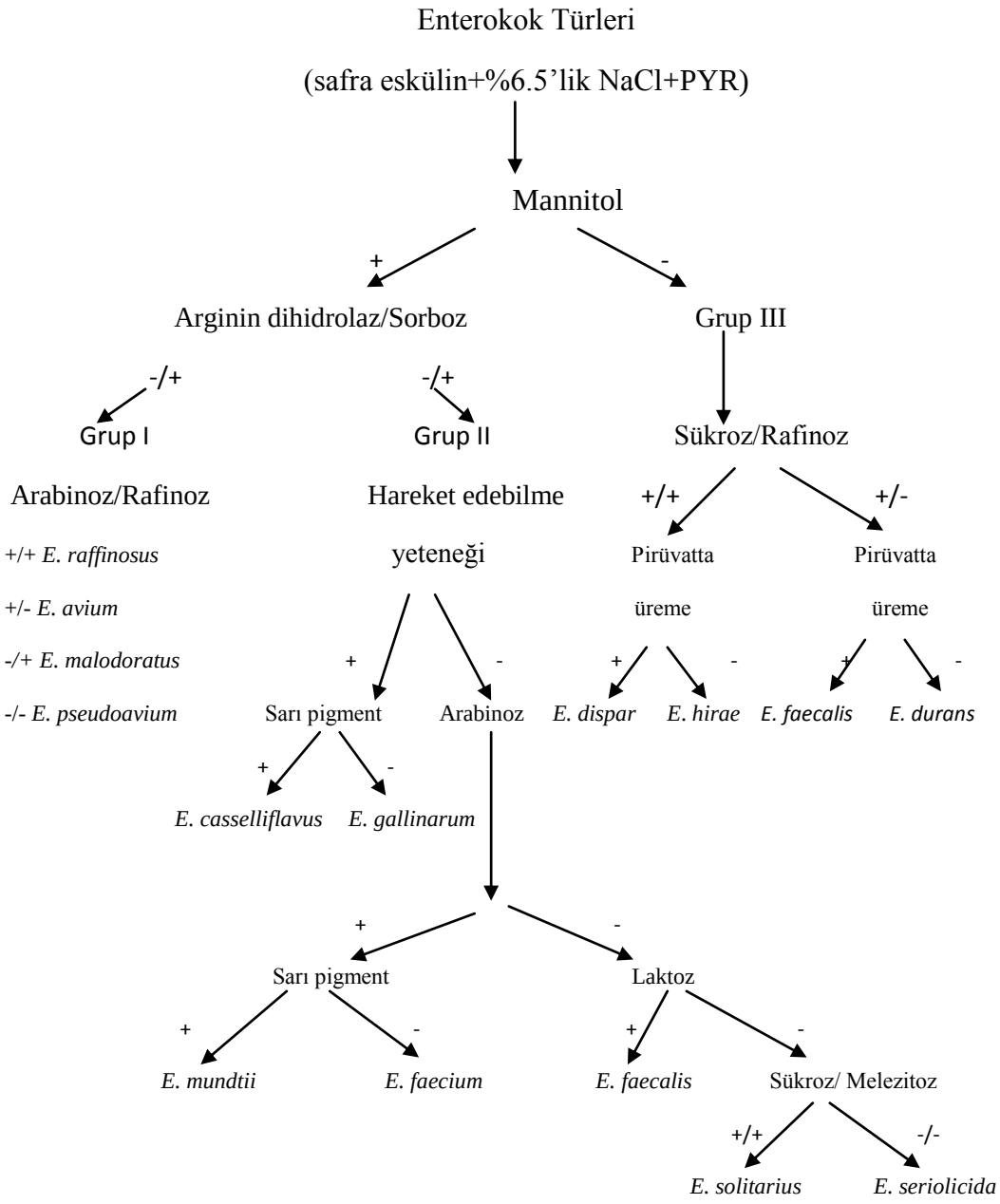
Grup 2: Mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler. Ayrıca arginini hidrolize ederler. Bu grup *E. faecalis, E. faecium, E. casselliflavus, E. haeperoxidus, E. mundtii* ve *E. gallinorum*'dan oluşur.

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

Grup 4: Mannitol ve sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmaz ve arginini hidrolize etmezler. *E. sulfurens, E. asini, E. phoeniculicola* ve *E. cecorum* bu grupta bulunur. Sorbitol içeren sıvı besiyerinde ise *E. cecorum* asit oluştururken, *E. sulfurens* asit oluşturmaz.

Grup 5: Bu gruba ait türler arginini hidrolize etmezler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler. *E. columbae, E. canis, E. maravenis* bu gruptadır.

Tablo 2. Enterokokların identifikasyonu



2.2.4. Enterokokların İzolasyonu ve Tanımlanması

Enterokokların tür düzeyinde tanımlanması; tedavi, epidemiyolojik çalışmalar ve enfeksiyon kontrol amaçlı olarak yapılmaktadır. Vankomisine dirençli enterokokların çoğunluğunu *E. faecium* suşları oluşturmaktadır. VRE suşlarının tarama amaçlı özellikle rektal sürüntülerden ve gaita örneklerinden hızlı saptanmasına yönelik agar ve sıvı besiyerleri

kullanılmaktadır. Enterokoklar, %5 koyun kanlı agar, beyin kalp infüzyon agar, koyun kanlı triptikaz soy agar gibi çeşitli besiyerlerinde kolaylıkla üredikleri için bu besiyerleri tanımlamada tercih edilmektedir (31). Ancak son yıllarda bunlara ek olarak daha hızlı sürede ve kolaylıkla tanımlama sağlayan kromojenik besiyerleri daha sık kullanılmaktadır. Enterokok şüphesi olan örneklerin taşınmasında transport besiyerleri kullanılır. Gönderilen örnekte gram negatif bakterilerin de olma olasılığı varsa seçici özelliği olan besiyerlerinin kullanılması, tanımlamayı kolaylaştırması açısından önemlidir. Bu amaçla enterococcosel agar, kolombiya kolistin nalidiksik asit agar ve kromojenik agarlar kullanılabilir. Son yıllarda sıklıkla karşılaşılan vankomisin dirençli enterokokların belirlenmesinde ilk basamak, VRE'nin en hızlı şekilde tanımlanıp yayılımını önlemektir. Bu amaçla tanımlamada kullanılan besiyerlerine genellikle 8 μg/mL oranında vankomisin eklenir.

Koyun kanlı agarda 24 saat inkübe edildikten sonra streptokoklardan daha büyük, gri, parlak, buğulu görünümlü koloniler oluştururlar. Bu kolonilere katalaz testi yapılır ve katalaz negatif ve gram pozitif olan örneklerde tür düzeyinde tanımlama işlemi yapılır (109).

2.2.4.1. Ticari sistemlerle tanımlama

Tür düzeyinde tanımlama için çeşitli fenotipik yöntemler kullanılabilirse de otomatize ve yarı otomatize sistemler hızlı sonuç vermeleri sebebiyle daha çok tercih edilir. Bu sistemlere örnek olarak; API20S, API20A, API Rapid ID 32 Strep, Vitek 1-2 Maldi-TOF MS verilebilir. Genellikle enterokok izolatlarının büyük bir çoğunluğu bu sistemlerin herhangi biri ile doğru olarak tanımlanmaktadır.

2.2.4.2. Moleküler yöntemlerle tanımlama

Bunların yanında enterokok türlerinin hızlı ve doğru tanımlanması için çeşitli moleküler yöntemlerde kullanılabilir (55). Bu yöntemlerden bazıları şunlardır: Sodyum-dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi, tüm hücre protein profili, vibrasyonel spektroskopik analiz, proton magnetik rezonans spektroskopik analiz, randomize amplifiye polimorfik DNA analizi, 16S rRNA geninin sekans analizi, PZR ile çoğaltılmış 16S rRNA geninin restriksiyon-fragman uzunluk-polimorfizm analizi, 16S rRNA geninin veya *gro*ESL geninin geniş aralık amplifikasyonu, 23S rRNA geninin domain V'in sekanslanması, tRNA veya rRNA'nın "intergenic spacer" amplifikasyonu, D-ala: D-ala ligazların ve vankomisin direnç genlerinin amplifikasyonu, *Enterococcus* protein A genlerinin veya *E. faecalis* kollajen adezin geninin problanması, EF-Tu elongasyon faktörü veya pEM1225 genlerinin amplifikasyonu,

manganeze bağımlı süperoksid dismutaz geninin sekanslanması, chaperonin 60 geninin sekanslanması, RNA polimeraz β alt birim geninin sekanslanması, RNA polimeraz alt ünite ve fenilalanil-tRNA sentaz genlerinin ve ATP sentaz geninin sekanslanması. Bu testlerin çoğu bütün enterokok türlerine uygulanabilse de bir kısmı türe özgüdür (1).

Farklı enterokok türlerinin tanımlanması için önerilen moleküler teknikler arasında tüm hücre protein profillerinin sodyum-dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi analizi ve 16S rRNA genlerinin sekanslanması referans yöntemler olarak kullanılmaktadır (1).

2.2.5. Epidemiyoloji

Enterokoklar zor şartlar altında üreyebilir ve canlılıklarını sürdürebilirler. Doğada (toprakta, suda, hayvanlarda ve bitkilerde) yaygın olarak bulunurlar. Ancak esas konakları insan ve hayvanların gastrointestinal sistem florasıdır. Bağırsak florasının önemli bir bölümünü oluştururlar. 1 gram dışkıda 10^5-10^7 kob (koloni oluşturan birim)'dan daha fazla oranlarda bulunurlar. Dışkıda en sık tanımlanan türler *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur (36). Yayılımlarında kolonize veya enfekte hasta ile direkt temas, sağlık çalışanlarının ellerinden geçiş, kontamine cihazlar veya çevre etkilidir (95).

Uzun süre hastanede yatan hastaların odalarındaki eşyalar ve yüzeyler sıklıkla kontamine olur ve VRE bulaşı için ortam oluşur. VRE'ler hasta çamaşırları, masalar, karyola kenarları, telefon, kapı tokmakları, steteskop, termometre, tansiyon aleti, EKG elektrotları, klozetler gibi tüm eşya ve yüzeylerden izole edilebilirler (17, 39). VRE kolonizasyonu hasta hastaneden çıkış yaptıktan sonra da uzun süre devam eder. Bu sebeple hasta epikrizinde VRE ile kolonizasyon veya enfeksiyon belirtilmeli ve hastanın tekrar yatışı söz konusu olduğunda ilk olarak sürveyans kültürü yapılmalı, sonuçlanıncaya kadar hasta izole edilmelidir (27).

NNNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System) verilerine göre VRE enfeksiyonlarına bağlı hastane enfeksiyonlarında son yıllarda 20 kata varan artış gözlenmiştir (88).

2.2.6.Virulans faktörleri

Enterokoklar, düşük virulansa sahip bakterilerdir. Klasik bir virulans faktörlü olmamasına rağmen çok sayıda antimikrobiyale dirençli olmaları, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan hastalarda yaşama ve çoğalmalarına izin vererek süperenfeksiyonlara yol açmaları ve özellikle glikopeptide dirençli suşların hastanede yayılması nedeniyle önemlidir (85, 105). En önemli virulans faktörleri; hemolizin ve sitolizin, jelatinaz, enterokokal yüzey proteini, agregasyon faktörü, lipoteikoik asit, süperoksit, seks feromonları, hyalurinidaz, kapsül, hücre duvarı polisakkaritleri, AS-48 ve antibiyotik direncidir.

2.2.6.1. Hemolizin ve sitolizin

Sitolizin, hemolitik özellik taşımakla birlikte eritrositlere karşı litik aktivite gösteren bir sitotoksik proteindir. Sitolizin kodlayan gen bölgesi kromozoma entegre olarak ya da plazmid üzerinde bulunabilmektedir (54). Direkt doku hasarına yol açtığı, immün sistem üzerinde makrofaj ve polimorfonükleer lökositlere zarar verici etkisi olduğu ve bakteriyosin olarak da işlev gördüğü gösterilmiştir (64, 105).

2.2.6.2. Jelatinaz

Enterokokların yaklaşık olarak %45-68'inde jelatinaz üretiminden sorumlu olan "fsr" bulunduğu gösterilmiştir. Jelatinaz üreten suşların toksik etkisinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (64).

2.2.6.3. Enterokokal yüzey proteini

Biyofilm oluşumunda, hücre duvarına tutunma da ve bakterinin immün yanıttan kaçışında etkili olan bir proteindir. Ayrıca bakteriyemi ve endokardit ile ilişkili yüksek moleküler ağırlığa sahip, konjugasyonla enterokok izolatları arasında aktarılabilir özelliktedir (105).

2.2.6.4. Agregasyon Faktörü

Bir yüzey proteini olan agregasyon faktörü, hücreler arası teması düzenleme, hücre dışı matriks proteinlerine adezyonla konak hücreye yapışma ve hücre yüzey hidrofobitesini arttırma gibi özellikleri ile virulansta görevlidir. Ayrıca enterokokların kalp kapakları ve böbrek epitel hücrelerine bağlanmasını sağlayarak endokardit ve üriner sistem enfeksiyonlarının oluşumunda etkili olurlar. Agregasyon faktörü plazmid transferini de kolaylaştırır (74, 102, 109).

2.2.6.5. Lipoteikoik Asit

Grup D ve enterokokların yapısal antijenidir. Tumor Necrosis Factor (TNF) ve interferon (IFN) yapımını uyararak immün yanıtın düzenlenmesini sağlar ve virulansta görev alır. AS-48 bazı *E. faecalis* suşları tarafından salınan bir bakteriyosindir. Litik özelliktedir. *E. faecalis* suşlarında adhezif özelliği gösterilen lipoteikoik asitin donör hücrenin ürettiği agregasyon faktörü için alıcı hücrede reseptör görevi gördüğü ve bu yüzden plazmid transferi ve agregat oluşumunu kolaylaştırarak virulansa katkı sağladığı düşünülmektedir (46, 64, 105).

2.2.6.6. Süperoksit

E. faecalis ve *E. faecium* türlerinin büyük çoğunluğunda sentezlenmektedir. Süperoksit üretiminin bakterinin yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (54, 73, 105).

2.2.6.7. Seks feromonları

Seks feromonları kromozomda kodlanan, 7-8 amino asit uzunluğunda küçük, hidrofobik peptitlerdir. *E. faecalis*'te sinyal peptidleri olarak işlev görürler. *E. faecalis*'te belirli konjugatif plazmidlerin transferi seks feromon sistemi ile birkaç kat arttırılır. Alıcı bir suş besiyerine plazmidle uyumlu ancak onunla taşınmayan seks feromonları sekrete eder, cevap olarak verici suş ***Af*** sekrete eder. Böylece alıcı ve verici hücre arasında sıkı temas sağlanır ve konjugatif plazmidin geçişini kolaylaştırır (35, 54, 74).

2.2.6.8. Hyaluronidaz

Hyaluronik asiti tahrip ederek doku hasarına yol açan bu enzim, bağ dokuda mukopolisakkaritlerin bir kısmını depolimerize ederek bakterinin yayılmasını sağlar. Hyaluronidaz kendi zarar verici etkilerinin yanında, diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerini kolaylaştırabilir ve doku hasarının şiddetlendirir. Hyaluronidaz enzimi diş çürüklerindeki doku hasarında rol oynayarak, enterokokların kök kanalından periapikal lezyonlara geçişini kolaylaştırmaktadır (45, 64).

2.2.6.9. Kapsül, polisakkaritler ve hücre duvarı

Kapsül enterokokların immün yanıttan kaçmasını sağlayarak, virulansa katkı sağlar (64, 105). Klinik *E. faecalis* izolatlarında yaygın olarak üretilen kapsül polisakkaritini kodlayan bir operon bulunmaktadır. Bunun dışında hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* izolatlarında ikinci bir kapsül polisakkariti daha tanımlanmıştır. Her iki polisakkaride karşı oluşan antikorlar koruyucudur. Enterokoklarda hücre duvarı, beta-D glikoz-1-fosfat, teikoik asit ve tetraheteroglikan komponentlerinden oluşur. Opsonik antikorlar için hedef olan bu yapılarda virulansın yanı sıra karşı koruyucu immünite için hedef rolü oynarlar. Bu sebeple aşı oluşturmadaki önemleri araştırılmaktadır (101).

2.2.7. Enterokokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar

VRE enfeksiyonları yüksek mortalite ve sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunudur olup hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %12'sinden sorumludur (59). Hemotolojik malignensili hastalar, organ transplantasyonu yapılanlar ve immünsupresif hastalar VRE'nin en sık görüldüğü hasta gruplarıdır (112). Enterokoklar; bakteriyemi, üriner sistem enfeksiyonları, endokardit, intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları, santral sinir sistemi enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları ve neonatal enfeksiyonlara neden olmasının yanında aralarında en çok problem yaratan enterokok bakteriyemisidir. Üriner sistem enfeksiyonları ise en sık rapor edilen enfeksiyonlardır. Tüm enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ından *E. faecalis* %5-15'inden *E. faecium* sorumludur (102).

2.2.7.1. Üriner sistem enfeksiyonları

Sistit, pyelonefrit, prostatit ve perinefritik abse gibi üriner sistem enfeksiyonlarına neden olurlar ve nadir bir komplikasyon olarak da bakteriyemi gelişebilir (79). Bu enfeksiyon; üriner kateterizasyon, üriner alet kullanma, üriner sistem patolojisi ve önceden antibiyotik alımına bağlı olarak gelişir (18).

2.2.7.2. Bakteriyemi

Enterokokal bakteriyemi, mortalite populasyona bağlı olarak değişmesine rağmen sık görülen bir klinik formdur. VRE bakteriyemileri, hastane kökenli tüm bakteriyemiler içerisinde Avrupa'da 4. , ABD'de ise 3. sıklıkta görülmektedir. Oranın yüksek olmasının nedeni çoğunlukla altta yatan faktörlerle ilişkilidir. En sık görülen neden üriner sistem enfekiyonları (%9-24) olmasının yanında intraabdominal enfeksiyonlar, hepatobiliyer sistem, özellikle diyabetik ayak ve dekübit ülserler olmak üzere deri ve yumuşak doku enfeksiyonları da etkilidir (26, 66).

Enterokok bakteriyemisine bağlı enfeksiyonlar sıklıkla nozokomiyal kaynaklıdır. Bakteriyemi için risk faktörleri; hemodiyaliz, organ transplantasyonu, kortikosteroid kullanımı, kemoterapi veya parenteral beslenme, cerrahi girişimler, ciddi hastalıklar, uzun süreli antibiyotik kullanımı, üriner kateterler, nötropeni ve mukozittir (35, 109).

2.2.7.3. Endokardit

Enterokoklar enfektif endokarditlerin *S. viridans* ve *S. aureus*'tan sonra 3.en sık rastlanan etkenidir. Bakteriyel endokarditlerin %5-15'inden sorumludurlar. Sıklıkla etken *E. faecalis*'tir. Altta yatan bir kapak hastalığı, protetik kapak, damar içi ilaç bağımılılığı alışkanlığına bağlı olarak gelişebileceği gibi, enterokoklar normal kapaklarda da enfeksiyon oluşturabilirler (109).

2.2.7.4. Karın içi ve pelvik enfeksiyonlar

Enterokoklar karın içi ve pelvik enfeksiyonlarda sıklıkla diğer aerop ve anaerop bakterilerle birlikte bulunurlar. Diğer bakteri türlerine özellikle *E. coli* ve *B. fragilis*'e göre daha az oranda gastrointestinal kaynaklı bakteriyemi yapmalarından dolayı genellikle göz ardı edilirler (36).

2.2.7.5. Yara ve yumuşak doku enfeksiyonları

Enterokoklar genellikle cerrahi yara enfeksiyonları, dekübit ülserler ve diyabetik ayak enfekiyonlarında gram negatif basiller ve anaerob bakterilerle birlikte izole edilirler. Nadiren de selülit veya diğer derin doku enfeksiyonlarına yol açarlar (109). Ancak yanık veya ülserlerden izole edilen enterokokların varlığı her zaman enfeksiyon olarak yorumlanmamalıdır (30).

2.2.7.6. Menenjit

Enterokok menenjiti genellikle santral sinir sisteminde anatomik bir defekt, önceden geçirilmiş beyin ameliyatı, kafa travması gibi predispozan faktörlere bağlı olarak gelişir ve nadiren görülür (109). AIDS, akut lösemili hastalar ve yenidoğan sepsisinde de bazen enterokokal menenjitler görülebilmektedir. Etken sıklıkla *E. faecalis* olup daha seyrek olarak da *E. faecium*'dur (29, 30, 109, 112).

2.2.7.7. Solunum yolu enfeksiyonları

Enterokoklar altta yatan hastalığı olan ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastalarda nadiren pnömoniye yol açmakta, bu tip enfeksiyonların sıklığı giderek artmaktadır (96).

2.2.7.8. Pediyatrik enfeksiyonlar

Enterokoklar yenidoğanlarda da erken ve geç sepsise neden olurlar. Yenidoğan sepsisi ve menenjit olgularının %13'ünde etken olarak izole edilirler. Sepsis; ateş, solunum güçlüğü ve bakteriyemi veya menenjit şeklinde seyreder. Genellikle prematüre, düşük doğum ağırlıklı, abdominal cerrahi girişimleri ve İV kateteri olan yenidoğanlarda görülür (68, 109).

2.2.8. VRE Kolonizasyonunun ve Enfeksiyonunun Önemi

VRE'ler genellikle gastrointestinal sistemde ve deride kolonize olup, cansız ortamlarda da yaşamını sürdürebilir. VRE kolonizasyonu sağlıklı kişiler arasında nadir görülür. Kolonize kişiler ise altta yatan ciddi hastalıkların varlığında hayatı tehdit eden enfeksiyonların riski altındadır.

VRE kuru yüzeylerde 7 günden- 4 aya kadar canlı kalabilir ve kontaminasyonda rol oynayabilir (76). Gastrointestinal kolonizasyonun süresi ise 7 hafta ile 3 yıl arasında değişebilir (95). Uzamış kolonizasyon hastanede uzun süre yatış, yoğun bakım ünitesinde yatış ve antibiyotik kullanımı ile ilişkilidir (18). VRE taraması amacıyla perirektal veya rektal kültürlere dayalı sürveyans uygulanan bazı hastanelerde kolonize/enfekte hasta oranının 10/1'e kadar çıktığı bildirilmiştir (31). Enterokoklar hastane personelinin gastrointestinal sisteminde de kolonize olabilirler. Diğer önemli kolonizasyon bölgeleri ise yara ve kronik dekübit ülserleridir (40). Hastaların giysileri ve çarşafları, yataklar, döşemeler, kapı tokmakları, lavabolar ve tıbbi cihazlar (glukometreler, tansiyon aletleri, elektronik termometreler, EKG cihazı) VRE ile kontamine olabilir ve bu mikroorganizmalar için ciddi rezervuardırlar (90).

VRE ile kolonize olan hastalar veya cansız yüzeylerden diğer hastalara bulaş nedenleri; VRE ile kontamine olmuş sağlık çalışanlarının elleri en sık neden olup, kıyafetleri, kontamine olmuş tıbbi cihazların kullanımı ve kontamine olmuş hastane ortamıdır (76, 100). VRE enfeksiyonlarının, vankomisine duyarlı enterokok enfeksiyonlarından daha yüksek mortalite, morbidite, sınırlı tedavi seçenekleri, artmış maliyet, hastanede yatış süresinde artış nedenleriyle önemi artmıştır. Bu nedenlerden ötürü VRE' lerin yayılımının ve ortaya çıkışının epidemiyolojik olarak araştırılması gerekmektedir (78, 91).

VRE için ana giriş kapıları üriner sistem, batın içi (özellikle safra sistemi), yaralar (cerrahi yaralar ve dekübit ülserleri), intravasküler kataterlerdir. Deride VRE kolonizasyonu olan hastalarda intravasküler katater ilişkili sepsis riski artar. Karaciğer transplantasyonu yapılanlarda ise VRE bakteriyemisinin en sık kaynağı batındır. Barsaklardan translokasyon, santral venöz kataterler ve üriner sistem nötropenik hastalarda VRE bakteriyemisinin kaynağı olabilir (79). VRE bakteriyemisi için risk faktörleri hemodiyaliz, organ transplantasyonu, kortikosteroid kullanımı, kemoterapi, parenteral beslenme, uzun süre antibiyotik kullanımı, üriner kataterler, uzamış nötropeni ve mukoziti içeririr. (112).

2.2.9. Enterokoklarda antibiyotik direnci

Enterokoklar nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarında üçüncü, üriner sistem enfeksiyonlarında ikinci en sık izole edilen patojen olarak virulansı düşük düzeyde olmasına rağmen önem kazanmıştır (107). Kullanılan birçok antibiyotiğe intrensek olarak dirençli olmaları ve kullanımda olan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilme özelliğine sahip olmaları nedeniyle hastane ortamında sıklıkla karşılaşılmakta ve tedavileri de oldukça güç olmaktadır. Hiçbir antibiyotik enterokoklara karşı bakterisid etkiye sahip değildir. (31, 69).

Enterokoklarda antibiyotiklere direnç mekanizmaları 2 grupta incelenir.

1. Doğal direnç
2. Kazanılmış direnç

2.2.10. Doğal Direnç

Doğal direnç genleri tüm türlerde bulunur ve kromozomal kaynaklıdır. Penisilinaz duyarlı ve dirençli penisilinlere, nalidiksik aside, sefalosporinlere, klindamisine ve düşük düzeyde aminoglikozidlere karşı doğal dirençlidirler. Aminoglikozitler hücre duvarından yeterince geçmemesi ve yalnızca *E. faecium*'da bulunan aminoglikozid modifiye edici enzim (6'-asetiltransferaz) tarafından aminoglikozidin inaktivasyonu nedeniyle enterokoklar aminoglikozitlere karşı düşük düzeyde direnç gösterirler. (100).

2.2.11. Beta laktam direnci

Bütün enterokoklar beta laktamlara karşı tam veya relatif direnç gösterirler. Bu tip dirençte altta yatan temel mekanizma beta laktam antibiyotiklere düşük bağlanma afinitesi gösteren proteinlerin özellikle de PBP 5 (penisilin bağlayan protein) enziminin üretimidir. *E. faecalis* suşlarında penisilin MİK değeri streptokoklardan 10-100 kat daha yüksektir. Ancak bu tip dirence tüm enterokok türleri arasından en çok *E. faecium*'da rastlanır. Bu tür yarı sentetik ve penisilinaza dirençli beta-laktam grubu antibiyotiklere de dirençlidir. *E. faecium* ve *E. faecalis* için penisilin minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri 8 ile 64µg/mL arasındadır. Enterokokların çoğu, beta-laktamlara, vankomisin ve teikoplanin gibi hücre duvarına etki eden antibiyotiklere karşı tolerandır. Bu nedenle bu ajanlar bakterisidal değil, bakteriyostatik etkilidirler (6, 90).

2.2.9. Düşük düzeyde aminoglikozid direnci

Aminoglikozidlere düşük düzeyde direnç enterokokların yapısal özelliğidir. Enterokokların sitokrom enzimleri olmaması nedeniyle antibiyotiğin bakteri hücre duvarından geçişi kısıtlanır ve direnç meydana gelir. Hücre duvarına etkili penisilin veya glikopeptidlerle kombine edilerek sinerjistik etkiyle tedavide kullanılabilirler (90).

2.2.10. Diğer antibiyotikler

Enterokoklar linkozamid grubu antibiyotiklere karşı da düşük düzeyde direnç gösterirler. Ayrıca enterokokların eksojen folatı kullanma yetenekleri olduğundan

trimetoprime-sulfametoxazol (TMP-SMX)'e de interensek olarak dirençlidirler. İn-vitro şartlar da duyarlı görülseler de, invivo şartlarda etkisiz olduklarından antibiyotik duyarlılık testlerinde TMP-SMX kullanılmamalıdır. *E. faecalis* intrensek olarak quinupristin/dalfopristine'de dirençlidir. *E. gallinorum, E. asseliflavus* ve *E. flavescens*'te interensek olarak vankomisine düşük düzeyde direnç gösterirler (31).

2.2.9.2. Kazanılmış (Estrensek) direnç

DNA mutasyonu veya yeni bir DNA'nın aktarımına bağlı olarak gelişir. Genellikle plazmid ya da transpozonlar aracılığıyla aktarılır. Mutasyon sonucu oluşan dirençli genler, enterokoklar arasında veya başka mikroorganizmalara transfer edilebilir. Konjugasyon bu aktarımdan sorumlu en önemli mekanizmadır. Tetrasiklin direnci konjugasyonla kazanılmış direncin en tipik örneğidir (31).

2.2.11. Yüksek Düzeyde Aminoglikozid Direnci

Ribozomal mutasyon veya plazmid kaynaklı aminoglikozid modifikasyonu yapan enzim üretimi ile bazı enterokoklar, aminoglikozidlere karşı yüksek düzeyde direnç oluşturmaktır. Bu şuşlarda sinerjistik etki ortadan kalkmaktadır. Direnç da iki farklı mekanizma ile ortaya çıkar.

a-Ilımlı seviyede direnç: Düşük permeabiliteye bağlı olarak gelişir. MİK değeri 62-500 µg/ml arasında değişir. Beta-laktam grubu antibiyotiklerle kombine edilerek sinerjistik etkiyle problem aşılabilir (74).

b-Yüksek seviyede direnç: Aminoglikozidlerin ribozomdaki bağlanma bölgelerinde değişiklik veya aminoglikozidleri inaktive eden enzimlerin sentezi sonucu oluşur. Enzimleri kodlayan genler plazmid veya transpozonlar aracılığıyla aktarılırlar. Yüksek seviyede dirence yol açan bu iki yoldan aminoglikozid modifiye eden enzim üretimi en sık görülen direnç mekanizmasıdır. Bu dirence neden olan enzim 6'asetiltransferaz-2'fosfotransferaz, streptomisin dışındaki tüm aminoglikozidlere (gentamisin, tobramisin, netilmisin ve amikasin) karşı direnç oluşumunda rol oynar. Streptomisine karşı kazanılan dirençte ise 6-asetiltransferaz enzimi rol oynar. Enterokokların

gentamisine dirençli olmaları streptomisin dışındaki tüm aminoglikozitlere dirençli oldukları anlamına gelir. Ancak gentamisine duyarlılık, diğer aminoglikozitlere de duyarlı oldukları veya streptomisine dirençli olmaları diğer aminoglikozitlere de dirençli oldukları anlamına gelmez. Bu sebeple ciddi enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde uygulanacak stratejiyi belirlemek için bu antibiyotiklere karsı yüksek düzey direnç bulunup bulunmadığı test edilmelidir (109). Yüksek düzeyde aminoglikozid dirençli suşlar sinerjistik etkiye duyarlı değildir (61).

2.2.12. Vankomisin Direnci

Enterokoklarda peptidoglikan sentezinde 2D-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 buna transglikolizasyon yoluyla mevcut peptidoglikanın eklenmesi takip etmektedir. VRE ise farklı bir ligaz enzimi senteziyle D-ala-D-ala'daki alanin yerine laktat veya serin bağlayarak uç kısmın yapısını değiştirir ve D-ala-D-laktat veya D-ala-D-serin meydana gelerek vankomisinin hücre duvarına bağlanma yeteneğinin azalmasına neden olur, hücre duvar sentezi devam eder ve sonuç olarak vankomisine karşı direnç gelişir (31, 74). Önceden fenotipik olarak, MİK değerlerine göre yapılan direnç sınıflandırılması günümüzde spesifik ligaz genlerinin varlığına göre yapılmaktadır. Vankomisin direnci için tanımlanmış 6 fenotip vardır. Bunlar *vanA, vanB, vanC, vanD, vanE* ve *vanG* olarak tanımlanmıştır. *vanA, vanB, vanD ve vanG* tipi dirençte D-Ala-D-Laktat, *vanC* ve *vanE* tipi dirençte ise D-Ala-D-Serin sentezlenmektedir. Bu tiplerden beşi (*vanA, vanB, vanD, vanE, vanG*) kazanılmış dirençle uyumluyken *vanC* doğal direnç özelliğindedir (31, 74, 77).

***vanA* Tipi Direnç:** *vanA* tipi direnç Tn 1546 adı verilen 11kb'lık bir traspozonla aktarılır. Vankomisin direncinin oluşumunda yer alan *vanA* geni Tn1546 da diğerleri (*vanR, vanS, vanH, vanX, vanY, vanZ*) Tn5482 transpozonunda yer alır (100). Bu genlerin yardımıyla D-ala-D-ala yerine D-ala-D-lac ile sonlanan anormal peptidoglikan öncülleri sentezlenir. Vankomisin bu öncüllerle düşük düzeyde bağlanır. *vanH, vanA* ve *vanX*'in transkripsiyonunu *vanR* ve *vanS*'nin oluşturduğu sistemin regülasyonu sağlar. *vanS* vankomisin varlığını algılar ve *vanH, vanA* ve *vanX* promotorlarını aktive eden *vanR*'ye

aktarılır. *vanH* D-lac oluşumunu sağlar. *vanA* bunu, D-ala-D-lac sentezinde substrat olrak kullanır. *vanZ*'nin buradaki görevi kesin olarak bilinmemektedir (100).

vanA direnci sıklıkla *E. faecium* ve *E. faecalis*'te bulunurken, *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus*'da da saptanır (97). *vanA* tipi direnç *vanB*'ye göre daha yaygın görülen bir dirençtir (31).

***vanB* Tipi Direnç**: *VanB* tipi direnç, d-ala-d-ala dipeptidi yerine D-ala-D-lac oluşumuyla sonuçlanan peptidoglikan prekürsör sentezine dayanır. *vanB* kümesinin fonksiyonelliği ve organizasyonu *vanA*'ya benzer ancak regülasyonu farklılık gösterir (24). *vanR* ve *vanS* teikoplaninden etkilenmezken vankomisin ile indüklenirler. *vanB* tipi direnç gösterenler, vankomisine değişik düzeylerde (MİK:4-1024 µg/ml) dirençliyken, teikoplanine (MİK: 0,25-2 µg/ml) duyarlıdır.

vanB tipi direnç *E. faecium* ve *E. faecalis*'te saptanan bir direnç türüdür (100).

***vanC* Tipi Direnç:** Diğerlerinden farklı olarak doğal (intrensek) bir direnç türüdür (100). *vanC* fenotipi D-ser'le sonuçlanan peptidoglikan prekürsör üretiminin bir sonucu olarak konstitütif veya indüklenebilir dirence neden olur.

D-ala: D-ser ligazlarını kodlayan üç *vanC* geni tanımlanmıştır. Bunlar; *E. gallinarum*'da *vanC-1*, *E. casselliflavus*'da *vanC-2*, *E. flavescens*'te *vanC-3*'tür. *vanC* tipi direnç vankomisine düşük düzeyde dirençliyken, teikoplanine duyarlıdır.

Bu direnç için 3 proteine ihtiyaç vardır; D-ser'i üreten bir membrana bağlı serin racemase olan *vanT*; D-ala-D-ser sentezini indükleyen bir ligaz olan *vanC*; ve hem D, D-dipeptidaz, hem de D, D-karboksipeptidaz aktivitesine sahip olan ve D-ala ile sonlanan prekürsörlerin hidrolizine olanak sağlayan *vanXYc'*dir (24).

***vanD* Tipi Direnç**: Kazanılmış bir direnç türüdür. D-ala-D-lac'la sonuçlanan ardışık peptidoglikan prekürsör üretimine bağlıdır. Vankomisin (MİK:16-256 µg/ml) ve teikoplanine (MİK:2-64 µg/ml) dirençlidir. Bu tip direnç konstitutiftir ve diğer enterokoklara konjugasyonla aktarılmaz (24).

***vanE* Tipi Direnç:** İntrensek bir direnç türüdür. *vanE* fenotipi D-ala-D-ser ile sonlanan peptidoglikan prekürsör sentezine bağlı olarak vankomisine düşük düzeyde dirençli (MİK:16 µg/ml) ve teikoplanine (MİK:0,5 µg/ml) duyarlıdır. *vanE* gen kümesi *vanC* gen kümesiyle benzer yapıdadır (24).

***vanG* Tipi Direnç:** Nadir görülen kazanılmış bir direnç türüdür, transfer edilemez. Vankomisine düşük düzeyde dirençli (MİK:16 µg/ml), teikoplanine (MİK:0,5 µg/ml) duyarlıdır. D-ala-D-ser ile sonlanan indüklenebilir peptidoglikan prekürsör senteziyle

karakterizedir. Kromozomal *vanG* kümesi çeşitli *van* operonlarından elde edilen 7 genden oluşur. Diğer *van* operonlarına benzemeyen gen kümesi, varsayılan düzenleyici sistemini kodlayan 3 geni içerir (*vanUG, vanRG, vanSG*) (24, 31, 100).

2.2.13. VRE enfekiyonu/kolonizasyonu için risk faktörleri

VRE enfeksiyonu/kolonizasyonunu belirlemek için yapılan çok sayıda çalışma vardır. Bu çalışma sonuçlarına göre; (18, 31, 56).

2.2.13.1. Hastaya ait faktörler:

1. Malignite; hematolojik ve solid
2. Kronik böbrek yetmezliği, hemodiyaliz
3. Diabetes mellitus
4. Nötropeni
5. Organ transplantasyonu
6. Geçirilmiş intraabdominal cerrahi
7. Yüksek APACHE-II skoru

2.2.13.2. Hastaneye Ait Faktörler:

1. Yoğun bakım, diyaliz, transplantasyon, hematoloji-onkoloji ünitelerinde yatış
2. Hastanede yatış süresinin uzunluğu
3. VRE ile kontamine alet veya hastalarla temas
4. Kortikosteroid kullanımı
5. Enteral beslenme
6. Sukralfat kullanımı
7. Antineoplastik tedavi uygulamaları

2.2.13.3. Antimikrobiklerle ilgili risk faktörleri:

1. Antibiyotik tedavi süresi ve dozu
2. Vankomisin, 2-3.kuşak sefalosporinler, kinolon ve antianaerob antibiyotiklerin kullanımı
3. Operasyon öncesi barsak hazırlığı

2.2.14. VRE'den Korunma ve Kontrol Önlemleri

Enterokoklarda vankomisin direncinin artması üzerine Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) 'ne bağlı Hastane Enfeksiyon Kontrol Öneri Komitesi (HICPAC) 1995 yılında nozokomiyal VRE yayılmasını kontrol önlemlerine ilişkin bir öneri paketi yayınlamıştır (83).

Bu önerilerde özellikle üç noktanın önemi vurgulanmaktadır:

2.2.14.1. Uygun vankomisin kullanımı

2.2.14.2. Hastane personelinin eğitimi

2.2.14.3. Mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı

Nozokomiyal VRE yayılımının minimale indirilebilmesi için çok sayıda bölümün ve personelin işbirliğini gerektiren multidisipliner bir yaklaşıma ihtiyaç vardır.

2.2.15.1. Uygun vankomisin kullanımı

Vankomisin kullanımının VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu için risk faktörü olduğu birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu nedenle HICPAC önerilerinde uygunsuz vankomisin kullanımının önemi özellikle vurgulanmış, vankomisin kullanımının uygun olduğu ve olmadığı durumlar belirtilmiştir.

Vankomisin kullanımı ile ilgili HICPAC önerileri

Vankomisin kullanımının uygun olduğu durumlar

1. Beta-laktam antibiyotiklere dirençli gram-pozitif mikroorganizmaların neden olduğu ciddi enfeksiyonlar
2. Beta-laktam antibiyotiklere karşı ciddi alerjisi (hayati tehlike yaratan) olan kişilerde gram-pozitif mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonlar
3. Metranidazole yanıt vermeyen veya çok ağır seyreden antibiyotiğe bağlı ishal olguları
4. "American Heart Association" önerilerine uygun olarak enfektif endokardit profilaksisi
5. Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) veya Metisilin Dirençli *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) enfeksiyonlarının oranının yüksek olduğu merkezlerde protez cihaz implantasyonu içeren majör cerrahi girişimler öncesinde ki profilaksi

Vankomisin kullanımından kaçınılması gereken durumlar

1. Rutin cerrahi profilaksi
2. Febril nötropenik hastaların ampirik tedavisi: Sadece MRSA prevalansının yüksek olduğu hastanelerde ve febril nötropeni epizodunun başlangıcında, gram-pozitif enfeksiyon şüphesinin yüksek olduğu durumlarda ampirik vankomisin kullanımı önerilebilir.
3. Diğer kan kültürlerinin negatif olduğu durumlarda kan kültüründeki tek bir MRSE üremesinin tedavisi
4. Ampirik olarak 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 bebeklerde rutin profilaksi
10. Devamlı ambulatuar 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

Özellikle 1980' li yıllarda vankomisin kullanımı önemli ölçüde artmıştır ve uygunsuz kullanımın önüne geçilmesinin VRE salgınlarının önlenmesine yardımcı olacağını gösteren çalışmalar vardır. Ancak VRE vankomisin dışında diğer birçok antibiyotiğe de dirençli olduğu için sadece vankomisin kullanımının kontrol altına alınması yeterli değildir. Özellikle 3. kuşak sefalosporinlerin ve antianaerobik etkinliği olan antibiyotiklerin VRE kolonizasyonu veya enfeksiyonu için risk faktörü olduğu gösterilmiştir.

2.2.15.2. Hastane Personelinin Eğitimi

VRE yayılımının önlenmesinde eğitim büyük önem taşır. Eğitimin hemşire, laboratuvar personeli, eczacı, konsültan ve asistan doktorlar, öğrenciler, temizlik işlerinden sorumlu personel ve hasta bakımı ile ilgili diğer tüm personeli kapsayacak şekilde yürütülmesi gereklidir. Eğitim programında öncelikle VRE' nin neden önemli olduğu (maliyet, tedavi güçlüğü vb) açıklanmalı, ayrıca VRE epidemiyolojisi ve kontrol yöntemleri hakkında bilgi verilmelidir.

2.2.15.3. Mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı

VRE'lerin nozokomiyal yayılımının önlenebilmesi için VRE ile kolonize veya enfekte olan hastaların en kısa sürede belirlenmesi gerekir. Mikrobiyoloji laboratuvarı VRE'ye karşı önlem alınmasında ilk basamak olarak kabul edilir. Çünkü tüm kontrol çalışmaları laboratuvardan gelen sonuçlara göre yönlendirilir. VRE hem tanımlama, duyarlılık sonuçlarının hızlı ve doğru bir şekilde verilmesi, kontrol önlemlerinin erken dönemde uygulanabilmesini ve yayılımın sınırlanmasını sağlar. Hızlı ve doğru sonuç vermenin yanı sıra laboratuvar ve enfeksiyon kontrol bölümü arasındaki iletişimin de iyi olması bu konuda büyük önem taşır.

Literatürdeki VRE salgınları incelendiğinde VRE suşlarının yalnızca %45–50' sinin idrar veya kan örneklerinden izole edildiği görülmektedir. Bu nedenle VRE'nin bir kez izole edildiği her hastanede tüm örneklerde üreyen enterokokların vankomisin duyarlılığı yönünden test edilmesi gereklidir.

Vankomisin için MİK değerleri agar dilüsyon, agar gradiyent dilüsyon, broth makrodilüsyon veya manuel broth mikrodilüsyon yöntemlerinden biriyle saptanmalı ve inkübasyon süresi 24 saat olmalıdır. Disk difüzyon yöntemini kullanan laboratuvarlarda da plakların 24 saat süreyle inkübe edilmesi ve inhibisyon zonlarının ışık altında okunması önerilir. Klinik bir örnekten VRE izole edilmesi durumunda duyarlılık testinin bu yöntemlerden herhangi biri kullanılarak tekrarlanması, ikinci testin sonucu beklenmeden hemen enfeksiyon kontrol ekibine ve hastanın yattığı servise haber verilmesi gereklidir. Böylece kesin sonuç belli olana kadar hastanın izole edilmesi mümkün olur. İzolasyona devam edilip edilmeyeceğine kesin sonuca göre karar verilir.

Vankomisin direncinin (özellikle *vanB*) saptanmasında tam otomatize sistemlerin hepsi aynı ölçüde güvenilir değilken *vanA* tipi direncin saptanmasında ise tüm yöntemler aynı

güvenilirliğe sahiptir. Enterokoklardaki vankomisin direnci PZR kullanılarak da saptanabilir. PZR özellikle düşük düzeyde vankomisin direnci taşıyan enterokok suşlarındaki (*vanB* veya *vanC*) direncin saptanması için yararlı bir yöntemdir. VRE için rutin tarama kültürlerinin yapılması hem iş gücü hem de yüksek maliyete neden olmaktadır. Dışkıda PZR ile vankomisin direnci taranmasının bazı hastanelerde rutin VRE sürveyans kültürlerine alternatif oluşturabilecek "maliyet etkin" bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Ancak bu tür bir yöntemin tercih edilmesi durumunda suşların izolasyonu ve tiplendirilmesi mümkün olmayacağı için tarama yönteminin dikkatle seçilmesi gerektiği unutulmamalıdır. Hastane içindeki VRE yayılımının tek bir klondan mı veya birden fazla sayıda klondan mı kaynaklandığının belirlenmesi, enfeksiyon kontrol önlemleri açısından önem taşır (100).

2.2.16. Enterokok Enfeksiyonlarında Tedavi

Enterokok enfeksiyonlarının tedavisi, antibiyotiklere değişik düzeylerde direnç göstermeleri sebebiyle zor ve karmaşıktır. Enterokokların neden olduğu üriner enfeksiyonlar, peritonit ve yara enfeksiyonlarının çoğu ampisilin, penisilin veya vankomisin ile tedavi edilebilir. Bununla birlikte beta-laktamaz üretimi, yüksek düzeyli aminoglikozid ve penisilin direnci geliştirmeleri ve glikopeptidlere direnç görülmesi klinisyenin tedavi seçeneklerini giderek kısıtlamaktadır (106). Penisilin G, ampisilin, vankomisin ve teikoplanin gibi hücre duvarına etkili ilaçlar, klinik olarak erişilebilir konsantrasyonlarda enterokokların çoğuna bakteriyostatik etkilidir. Enterokok enfeksiyonlarında bakterisidal etki genellikle streptomisin veya gentamisin kombine kullanımı ile elde edilir (84)

2.2.17. Gastrointestinal Kolonizasyonun Eradikasyonu

Vankomisine dirençli enterokok eradikasyonunda amaç, kolonizasyonu olanlarda enfeksiyon riskini azaltmak, hastanedeki VRE rezervuarını sınırlamak ve enfeksiyon kontrolüne yönelik harcamaları azaltmaktır (3).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmaya Alınan Örnekler

Bu çalışmada, Marmara Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Ağustos 2012-Şubat 2014 tarihleri arasında *C. difficile* toksini bakılması isteği ile gönderilmiş dışkı örneklerinde VRE taraması yapılmıştır.

3.1.2. Çalışma Grubunu Oluşturan Örneklerin Belirlenmesi

Ağustos 2012 ile Şubat 2014 arasında *C. difficile* toksini bakılması amacıyla gönderilen farklı hastalara ait 158 dışkı örneği çalışmaya dahil edilirken, kültür isteği ile gönderilen örnekler çalışmaya alınmadı. Çalışma sonuçları değerlendirilirken, MİK ve PZR sonuçlarına göre vankomisine duyarlı saptanan enterokok kökenleri çalışma dışı bırakıldı. Çalışma öncesinde Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan gerekli izin alındı ve hastalar çalışmayla ilgili bilgilendirilerek, yazılı onam formu alındı (Ek.2).

3.1.3. Besiyerleri

- chromID VRE besiyeri (*bioMerieux*, Fransa)
- Koyun kanlı besiyeri (*bioMerieux*, Fransa)
- Beyin-kalp infüzyon agar (BKİA) besiyeri (Oxoid)
- Beyin-kalp infüzyon sıvı (BKİS) besiyeri (Oxoid)
- NaCl'li besiyeri (Sigma)

3.1.4. Kimyasal Maddeler

- NaCl (Merck)
- PZR Master Mix (Promega)
- H_2O_2 (Sigma H6520 USA)
- Agaroz (Sigma- A-9539 lot 013K0008)
- 10x PZR Buffer (Mg Free) (Promega M190G)
- 100 baz çiftli (bç) Marker (100 bp DNA Step Ladder) (Promega G6951)
- Primerler

Primerler

vanA	‘5-GGG AAA ACG ACA ATT GC-3’ (forward)
	‘5-GTA CAA TGC GGC CGT TA-3’ (reverse)
vanB	‘5-ATG GGA AGC CGA TAG TC-3’ (forward)
	‘5- GAT TTC GTT CCT CGA CC-3’ (reverse)

3.1.5. Kullanılan cihazlar

1. PZR cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler)
2. Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
3. Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
4. Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
5. Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
6. Mikrodalga Fırın (Arçelik)
7. Derin Dondurucu (Arçelik)
8. Etüv (Memmert)
9. Otoklav (Nüve- OT 020)
10. Hassas Terazi (Scaltec)
11. Buzdolabı (Indesit)
12. Vortex (NM- 110)
13. Distile su cihazı (Nüve NS 108)
14. Mikropipet Seti (Eppendorf- P 10-P100-F1000)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Dışkı Örneklerinde *C. difficile* Toksin Varlığının Saptanması

C. difficile toksininin belirlenmesi için özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek güvenilir bir yöntem olan enzim immunoassay testi (VIDAS *C. difficile* Toxin A&B, *bioMerieux*, Fransa) kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda *C. difficile* VIDAS Toxin A&B (*bioMerieux*, Fransa) kiti kullanılarak toksin varlığı belirlendi.

3.2.1.1. Toksin Yöntemi

1. 200 µl distile su ile yaklaşık 200 mg yarı katı/katı dışkı karıştırıldı.
2. 1000 µl dilüent eklendi.
3. Dışkılar ezilip, 12000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
4. 300 µl'lik süpernatan toksin bakılmak için alındı ve kitin kuyucuğuna eklendi. Yaklaşık 75 dakika sonra test tamamlandı.

3.2.1.2. Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Toksin varlığı veya yokluğu tablodaki değerlere göre belirlendi (Tablo 3).

Tablo 3. Toksin Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Test Değeri	Sonuç
<0.13	Negatif
≥0.13 ile <0.37	Ara Değer
≥0.37	Pozitif

3.2.2. Örneklerin Ekimi

Toksin özelliği belirlenen dışkılar, chromID VRE (*bioMerieux*, Fransa) besiyerine ekilip 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda üreyen mor-yeşil renkli kolonilerden preparat hazırlandı. Mikroskobik incelemede gram pozitif kok görülen koloniler enterokok şüpheli kabul edilip, saf kültür elde etmek için koyun kanlı agara pasajlandı ve 24

saat 37°C'de inkübe edildi. Elde edilen saf kolonilere katalaz testi, PYR testi, %6,5'lik NaCl'li besiyerinde üreme ve hareket testi uygulanarak *Enterococcus spp.* tanısı kondu. Tür düzeyinde tanımlama için API20 STREP (*bioMerieux,* Fransa) kullanıldı ve biyokimyasal özelliklerine göre türleri belirlendi. Vankomisin ve teikoplanin MİK'lerini belirlemek için gradiyent strip yöntemi kullanıldı. Vankomisin dirençlerinin doğrulanması ve VRE tanısının konulması için PZR ile direnç genleri belirlendi. Gradiyent strip ve PZR sonuçları değerlendirilerek örneklere VRE tanısı konuldu.

3.2.3.Tanımlamada Kullanılan Test ve Yöntemler

3.2.3.1. Katalaz testi

Enterokoklar, sitokrom enzimleri olmadığı için katalaz testinde negatif reaksiyon verirler. Enterokok olduğu düşünülen koloniden lam üzerine alınarak üzerine %3'lük H_2O_2 (hidrojen peroksit) damlatıldı. Damlatır damlatmaz hava kabarcığının oluşması pozitif test olarak kabul edildi. Katalaz testi negatif olan suşlar enterokok şüphesiyle değerlendirmeye alındı.

$$H_2O_2 + \text{Şüpheli Koloni} \xrightarrow{\text{Katalaz}} H_2O + O_2 \uparrow \text{ Hava kabarcığı}$$

3.2.3.2. Tuz tolerans testi

Enterokoklar %6.5'lik NaCl içeren besiyerinde ürerler. Bu amaçla BKİB içerisine %6.5 olacak şekilde NaCl eklendi ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Testi gerçekleştirmek için şüpheli kolonilerden öze ile alınıp BKİB içerisine ekim yapılarak 35°C de 24-48 saat inkübe edildi. Besiyeri içerisinde bulanıklık oluşturan suşlar pozitif olarak değerlendirilip çalışmaya alındı, oluşturmayanlar negatif kabul edildi.

3.2.3.3. PYR testi

PYR emdirilmiş filtre kağıdı üzerine 1-2 koloni bakteri kolonisi koyulup üzerine tampon çözeltisi damlatıldı ve 5 dakika beklendi. Süre sonunda üzerine %0.015 p-dimethyl-

aminocinnamaldehyde içeren ayıraçtan 1-2 damla damlatıldı. PYR hidrolizi sonucu oluşan beta naphthyamine ile ayıracın reaksiyona girmesi sonucu, filtre kağıdı üzerinde pembe renk oluşturan suşlar pozitif, renk değişimi olmayanlar negatif kabul edildi. PYR testi pozitif olan suşlar enterokok olarak değerlendirildi.

3.2.4. Enterokokların Tür Tayini

Elde edilen saf enterokok kolonilerinin tür düzeyinde tanımlanması için biyokimyasal özelliklere göre tür ayrımı yapan yarı otomozatize bir sistem olan API20 STREP (*bioMerieux,* Fransa) kullanıldı.

Koyun kanlı agara yapılmış 24 saatlik taze saf kültürlerden süspansiyon besiyeri içine 4 McFarland'tan daha bulanık olacak şekilde inokulum hazırlandı. Hazırlanan bu süspansiyon stripte bulunan Voges Proskauer (VP), hippurik asit hidrolizi (HIP), eskülin hidrolizi (ESC), pyrolidonyl arylamidase (PYRA), alfa-galactosidase (α GAL), beta-glucuronidase (β GUR), beta-galactozidase (β GAL), alcaline phosphatase (PAL), leucine amino peptidase (LAP) ve arginine dihydrolase (ADH) kuyucuklarına yaklaşık 100 µl kuyucukları tamamen dolduracak şekilde dağıtıldı. Bu süspansiyondan 500 µl GP mediuma eklendi. Hazırlanan yeni süspansiyon geriye kalan ribose acidification (RIB), arabinose acidification (ARA), mannitol acidification (MAN), sorbitol acidification (SOR), lactose acidification (LAC), trehalose acidification (TRE), inuline acidifition (INU), rafinose acidifition (RAF), amidon acidification (AMD) ve glycogene acidifition (GLYG) kuyucuklarına yalnızca tüpler dolacak şekilde dağıtıldı. ADH'tan GLYG'e kadar parafin yağ damlatıldı. Etüvde 37°C'de 4 saat aerobik koşullarda inkübe edildikten sonra VP testine birer damla VP1 ve VP2, HIP testine 2 damla NIN, PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP tüplerine birer damla ZYM A ve ZYM B damlatılarak oluşan reaksiyonlar değerlendirildi. Sayısal profil yapılıp, tür tayini yapıldı. Yapılan tespitin doğruluğundan emin olmak için 24 saatlik inkübasyonun sonunda ADH'tan GLYG'ye kadar olan kuyucuklar tekrar değerlendirildi.

3.2.5. Gradiyent Strip Yöntemi ile Vankomisin ve Teikoplanin MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Yayılım temeline dayanan plastik stripler üzerinde bulunan antimikrobiyal ajanla MİK değerinin saptanabildiği bir duyarlılık yöntemidir. Gradiyent stripin bir tarafında, belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde ilaç, diğer yüzünde de antimikrobiyal

ajanın stripin ucundan olan uzaklığa karşılık gelen konsantrasyonları bir cetvel gibi sıralanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenir. Gradiyent stripleri -20°C'de saklanır. Kullanımdan 30 dakika önce çıkarılıp oda sıcaklığına ulaşması sağlanır.

Gradiyent strip uygulaması için gerekli materyaller şunlardır:

1-Vankomisin E test stribi (*bioMerieux,* Fransa)

2-Teikoplanin E test stribi (*bioMerieux,* Fransa)

3-Beyin Kalp İnfüzyon Agar Besiyeri

4-İnokulum hazırlamak için Beyin-Kalp İnfüzyon Buvyon Besiyeri

5-Steril silgiçler

6-McFardland nefelometresi

7-Aplikatör

BKİA hazır toz besiyerinden (Oxoid) 37 gr alınıp 1000 ml distile su içinde eritildi. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve 9 cm çaplı petrilere 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü.

Koyun kanlı agara pasajlanmış 24 saatlik taze kültürden alınan, beyin-kalp infüzyon sıvı besiyeri içinde 2 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri inokulumu, beyin-kalp infüzyon agar besiyeri yüzeyine yayıldı ve 15 dakika plağın kuruması beklendi. Ardından gradiyent strip aplikatörü ile vankomisin gradiyent stripler plak üzerine yerleştirildi. 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda üretici firmanın önerileri doğrultusunda suşların MİK değerleri belirlendi. Stribin kestiği nokta MİK değeri olarak okundu.

CLSI önerilerine uygun olarak enterokoklar için vankomisin MİK değeri ≤4µg/ml olan suşlar duyarlı, 8-16µg/ml olan suşlar orta derece duyarlı, ≥32µg/ml olan suşlar dirençli olarak kabul edildi. Teikoplanin MİK değeri ≤8µg/ml olan suşlar duyarlı, 16µg/ml olan suşlar orta derece duyarlı, ≥32µg/ml olan suşlar dirençli olarak kabul edildi. Kontrol amacıyla *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanıldı (23).

3.2.6. Suşların Saklanması

Kültür ve antibiyotik duyarlılık testleri ile VRE olduğu saptanan suşlar skim-milk besiyeri içeren ependorf tüplerine alınarak PZR işlemi uygulanıncaya kadar -20ºC de saklandı.

3.2.7. Direnç Genlerinin PZR ile Belirlenmesi

Ependorf tüpleri içinde -20°C'de saklanmış olan suşları canlandırmak için koyun kanlı agara pasajlandı ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreyen kolonilerden 2. pasaj yapıldı ve tekrar inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra birkaç bakteri kolonisi alınıp steril distile su ile süspanse edildi. Süspansiyon 95ºC'de 20 dakika tutulduktan sonra 10000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan kısımdan alınarak amplifikasyon aşamasında kullanıldı.

Enterokokların vankomisine direncinden sorumlu önemli gen bölgeleri primer spesifik PZR tekniği ile çoğaltıldı. Direncin araştırılacağı hedef bölgeler ve bu bölgeler ile ilgili primer dizileri Dutka-Malen ve arkadaşlarının çalışmalarından seçildi (37). PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. PZR reaksiyonu son hacmi 25 µl olacak şekilde steril distile su, PZR Master Mix (Promega) ve primerler (*vanA, vanB*), ile ekstrakte edilen *Enterococcus spp.* (*E. faecalis* ve *E. faecium*) DNA'sı konularak hazırlandı (Tablo 4).

Tablo 4. *vanA, vanB* gen bölgelerinin PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	***vanA* gen bölgesi (732 bç)**	***vanB* gen bölgesi (635 bç)**
Distile su	7 µl	7 µl
PZR Master Mix	12,5 µl	12,5 µl
Primer (100pmol/µl) forward	1,5 µl	1,5 µl
Primer (100pmol/µl)	1,5 µl	1,5 µl
Toplam PZR karışımı	22,5 µl	22,5 µl
DNA ekstraksiyon süpernatanı	2,5 µl	2,5 µl
Toplam hacim	25 µl	25 µl

Hazırlanan PZR karışımı vortekslendikten sonra, her bir örneğe ait üzerinde numaraları yazılı steril 0,2 µl'lik PZR tüplerine 22,5 µl olacak şekilde paylaştırıldı ve üzerlerine 2,5 µl DNA örneği konulup termal döngü cihazına yerleştirildi ve PZR reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 5). Reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

3.2.8. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

Vankomisin direncinden sorumlu gen bölgeleri amplifikasyonla çoğaltıldıktan sonra %1.5'lik agaroz jele yüklenerek ürünlerin elektroforezi yapıldı. DNA'ların varlığı, uzunluğu belli DNA fragmentlerini içeren moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. Elektroforez tamponu için Tris-Borik Asit-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TBE] kullanıldı. 10xTBE stok çözeltisi kullanılmadan önce 1/10 oranında distile su ile sulandırılıp, tampon için 1xTBE kullanıldı. Yükleme sırasında pozitif ve negatif gen bölgeleri de jele yüklendi. Termal döngü cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4ºC'ye kaldırıldı.

Tablo 5. Vankomisin direncinden sorumlu *vanA* ve *vanB* direnç genlerinin amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	
Primer Bağlanması (Anneling)	54	1	
Zincir Uzaması (Extension)	72	1	30
Bekleme	4	-	-

3.2.8.1. Agaroz jelin hazırlanması

40 gr agaroz 100 ml 1xTBE ile karıştırılıp homojen hale gelinceye kadar ısıtıldı. 50°C sıcaklığa geldiğinde içerisine 10 µl etidyum bromür eklendi. Daha sonra hazırlanan jel bekletilmeden, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine hava kabarcığı bırakmadan döküldü ve katılaşana kadar beklendi. Sonrasında elektroforez tankına yerleştirildi. Daha önceden PZR amplifikasyonu yapılmış olan buzdolabında +4°C'de saklanan örneklerden 5'er µl alınarak yükleme tamponu (%20 sükroz veya gliserol, %0.25 brom fenol mavisi) ile iyice karıştırıldı. Elektroforez tankındaki jel kuyucuklarına yüklendi. Kullanılan mini tank için 80 Volt akım verilip elektrik akımı geçmesi sağlandı ve örnekler 30-40 dakika boyunca yürütüldü. Jel tanktan çıkarılarak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde kayıtları yapıldı.

3.2.8.2. *vanA ve vanB* Gen Bölgelerinin Tespiti

Agaroz jel elektroforez işleminden sonra vankomisine dirençli gen bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı reaksiyon tüplerinin elektroforezinde *vanA* gen bölgesi için 732 bç hizasında gözlenen bantlar hedef gen bölgesi olarak değerlendirildi. *vanB* gen bölgelerine spesifik primerlerin kullanıldığı reaksiyon tüplerinin elektroforezinde, 635 bç hizasında gözlenen bantlar hedef gen bölgeleri olarak değerlendirildi.

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Tüm veriler SPSS 17.0 versiyonu paket programına kaydedildi. Elde edilen verilerin karşılaştırılmasında Fisher'in Kesin Ki-Kare Testi kullanıldı ve $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Ağustos 2012-Şubat 2014 tarihleri arasında, Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na *C. difficile* toksini araştırılması isteği ile gönderilen farklı hastalara ait 158 dışkı örneği çalışmaya dahil edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışmaya Alınan Örneklerin Servis Dağılımı

Servisler	Hasta Sayısı	%
Pediyatri	99	62.7
Dahiliye	34	21.6
Gastroenteroloji	8	5.1
Enfeksiyon	6	3.8
Üroloji	3	1.9
Nöroloji	2	1.3
Hematoloji-Onkoloji	1	0.6
Jinekoloji	1	0.6
Kalp-Damar Cerrahisi	1	0.6
Ortopedi ve Travmatoloji	1	0.6
Anestezi	1	0.6
Beyin ve Sinir Cerrahisi	1	0.6
Toplam	158	100

Dışkıların 88'i (%55.7) toksin pozitif, 70'i (%44.3) toksin negatif bulunmuştur.

Tablo 7. Toksin Pozitiflerin Servis Dağılımı

Servisler	Hasta Sayısı	%
Pediyatri	60	68,2
Dahiliye	15	17
Gastroenteroloji	6	6,8
Enfeksiyon	5	5,8
Anestezi	1	1,1
Beyin ve Sinir Cerrahisi	1	1,1
TOPLAM	**88**	**100**

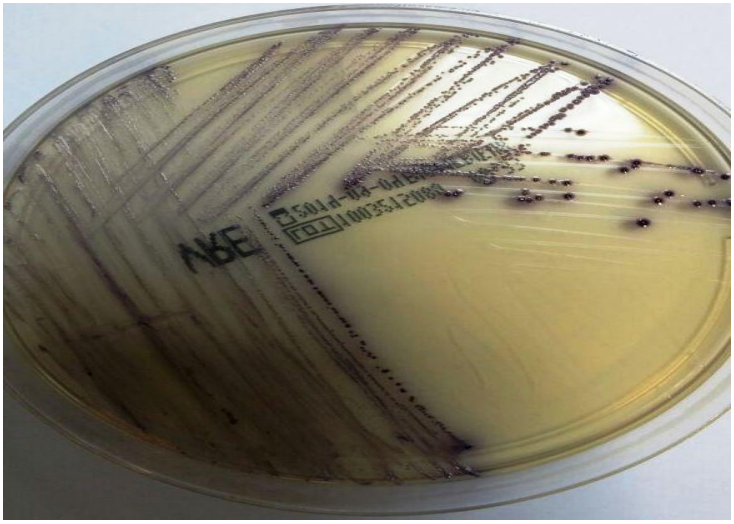
Tablo 8. Toksin Negatif Hastaların Servis Dağılımı

Servisler	Hasta Sayısı	%
Pediyatri	37	66,1
Dahiliye	13	23,2
Enfeksiyon	3	5,3
Ortopedi	1	1,8
Üroloji	2	3,6
Toplam	56	100

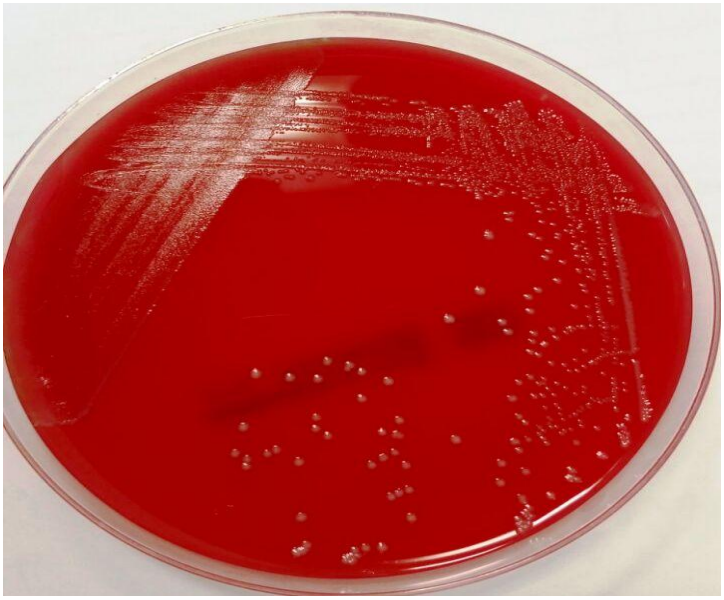
Dışkılar değerlendirildiğinde 88 toksin pozitif örnekten 27'sinde (%30.6) enterokok saptanmış, 70 negatif örneğinde 8'inde (%11.4) enterokok tanımlanmıştır. 27 toksin pozitif ve enterokok kolonizasyonu olan hastanın 17'si (%63) çocuk, 10'u (%27) erişkin hastadır. 8 toksin negatif, enterokok kolonizasyonu olan hastanın ise 5'i çocuk (%62.5), 3'ü (%27.5) erişkin hastadır.

4.1.Dışkı Örneklerinin Değerlendirilmesi

ChromID VRE (*bioMerieux*, Fransa) besiyerine ekilen dışkılar, inkübasyon sonrası incelenerek üreyen mor koloniler VRE olarak tanımlanmıştır (Resim 1). Aynı izolatlar koyun kanlı besiyerine pasajlandıktan sonra manuel tanımlamalar, katalaz negatifliği, PYR pozitifliği ve %6.5'lik NaCl'de üreme özellikleriyle yapılmıştır (Resim 2).



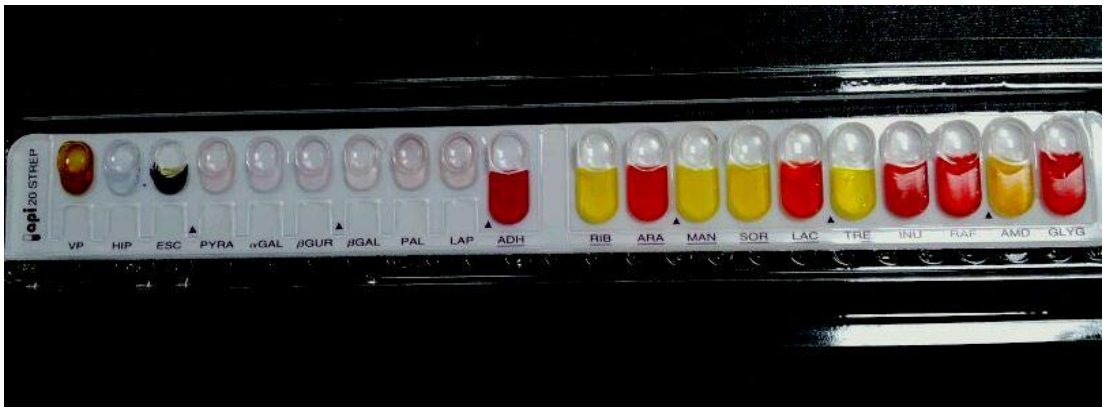
Resim 1. ChromID VRE besiyerinde VRE görüntüsü



Resim 2. Koyun kanlı agarda enterokok kolonilerinin görünümü

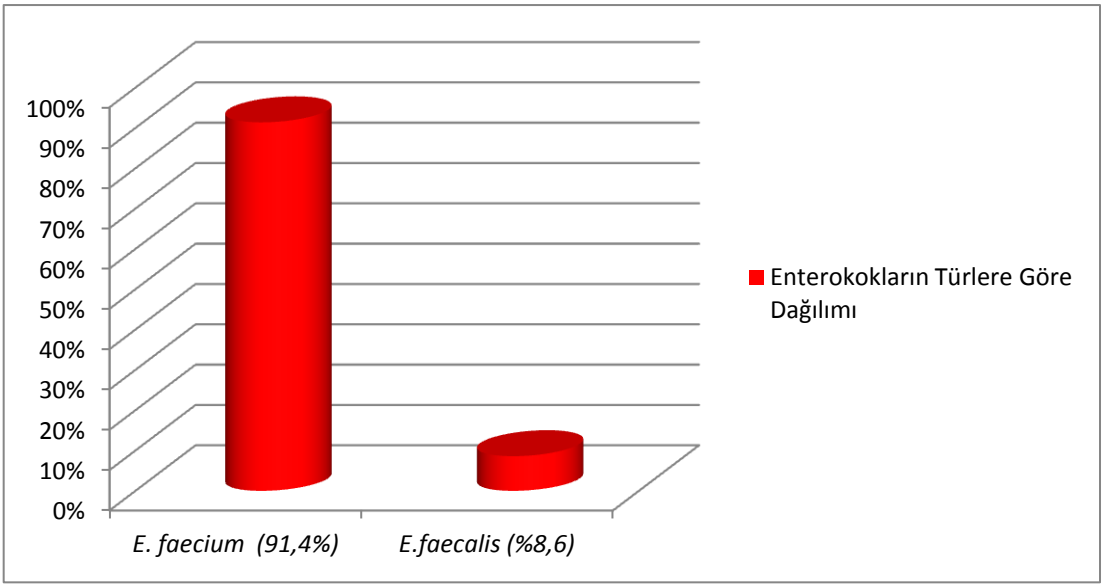
4.2.Enterokokların Tür Tayini Sonuçları

Enterococcus spp. olarak belirlenmiş suşların API20 STREP (*bioMerieux*, Fransa) tanımlama sistemi ile biyokimyasal özelliklerine bakılmış, sodyum pirüvat, hippürik asit, eskülin ferrik sitrat, pyroglutamik asit, 2-naftil-βD-galaktopiranosid, L-lösinβ-naftilamid, L-arginin, D-ribose, L-arabinoz, D-mannitol, D-trehaloz ve nişasta reaksiyonu pozitif, diğer tüm reaksiyonlar negatif olarak tespit edilen kökenler *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Elde edilen 35 suşun 32'si *E. faecium* (% 91.4), 3'ü *E. faecalis* (%8.6) olarak tespit edilmiştir.



Resim 3. İzole edilen mikroorganizmanın biyokimyasallara etkisinin API20 STREP ile değerlendirilmesi. (çalışmamızdan).

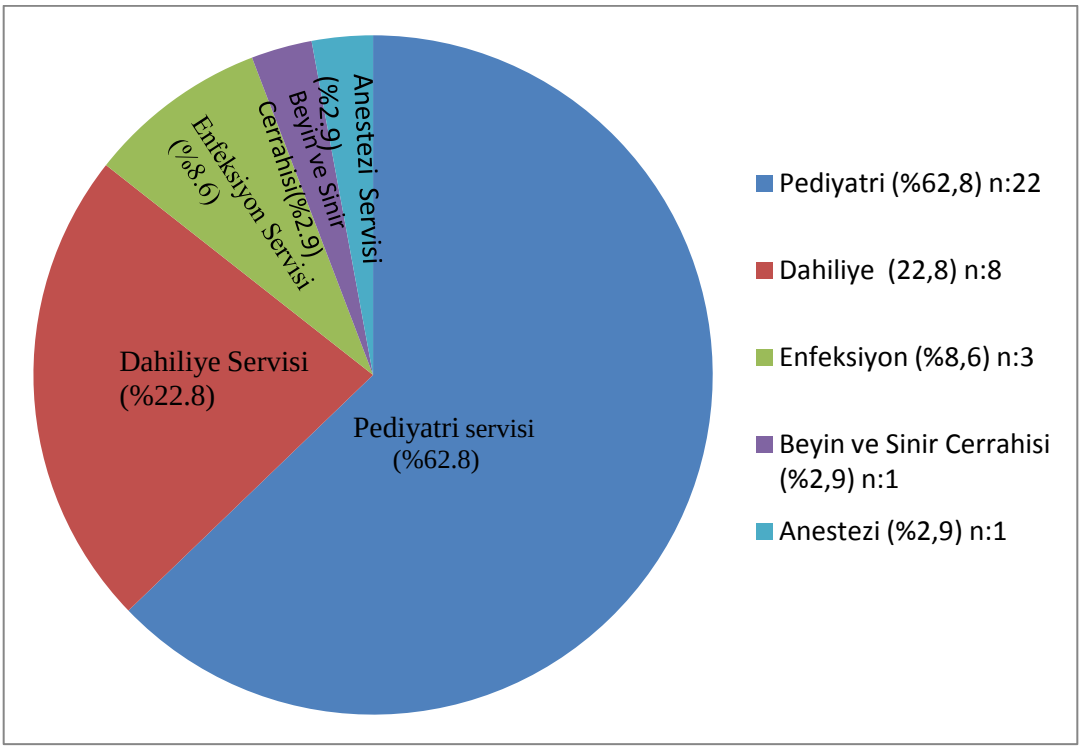
ChromID VRE besiyeri sonuçları API20 STREP sonuçlarıyla %100 uyumlu bulunmuştur.



Şekil 2. Enterokokların tür dağılımı

4.3. Enterokokların Servislere Göre Dağılımı

Enterokokların servislere göre dağılımları değerlendirildiğinde en fazla enterokok izole edilen bölümün pediyatri servisi, ikinci sırada da dahiliye servisi olduğu görülmüştür. Diğer servislerden izole edilen oranlarda belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. (Şekil 3)



Şekil 3. Enterokokların servislere göre dağılımı

4.4. Pediyatri ve Dahiliye Servisinden Gelen Örneklerin Değerlendirmesi

Çalışma dönemi boyunca en fazla toksin isteği yapılan bölümün pediyatri servisi olduğu görülmüştür. Pediyatri örneklerinin (n:99) 60'ında (%60.6) toksin pozitifliği saptanmış, bunların 17'sinden (%28.3) enterokok izole edilmiştir. 39 toksin negatif örneğin ise 5'inde (%12.8) enterokok saptanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9. Pediyatri Servisinden Gelen Örneklerde Enterokok Oranı

Toksin Varlığı	Enterokok Pozitif	Enterokok Negatif	Toplam
Toksin Pozitif	17 (28.3)	43 (71.7)	60
Toksin Negatif	5 (12.8)	34 (87.2)	39
Toplam	**22 (22.2)**	**77 (77.8)**	**99**

Toksin isteğinin fazla olduğu ikinci servis dahiliyedir. Toksin isteği yapılan 34 örnekten 15'inde (%44.1) pozitiflik gözlenmiş, bunların 6'sında (%40) enterokok saptanmıştır. 19 toksin negatifin ise 3'ünde (%15.8) enterokok izole edilmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. Dahiliye Servisinden Gelen Örneklerde Enterokok Kolonizasyonu

Toksin Varlığı	Enterokok Pozitif	Enterokok Negatif	Toplam
Toksin Pozitif	6 (40)	9 (60)	15
Toksin Negatif	3 (15.8)	16 (84.2)	19
Toplam	**9 (26.5)**	**25 (73.5)**	**34**

Örneklerin geldiği diğer servislerde ise 3 tane enfeksiyon (%8.6), 1 tane beyin ve sinir cerrahisi (%2.9), 1 tane anestezi servisi (%2.9) olmak üzere toplamda diğer servislerden 5 tane enterokok izole edilmiştir.

4.5. Enterokokların Vankomisin ve Teikoplanin Duyarlılıklarının Tespiti

Tespit edilen 35 enterokok; gönderildikleri klinikler, hastaların yaşları, *C. difficile* toksin özelliklerine göre değerlendirilmiş, tür düzeyinde tanımlandıktan sonra vankomisin ve teikoplanin duyarlılıkları açısından gradiyent strip yöntemiyle değerlendirilmiştir.

4.6.Enterokokların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

35 enterokok izolatı vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri CLSI kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Vankomisin için MİK değeri ≤4µg/ml duyarlılık, 8-16µg/ml orta duyarlılık, ≥32µg/ml dirençlilik olarak, teikoplanin için MİK değeri ≤8µg/ml duyarlılık, ≥32µg/ml dirençlilik olarak kabul edilmiştir (23). Buna göre 19 (%54,2) izolat vankomisin ve teikoplanin açısından dirençli bulunmuştur. Dirençli bulunan suşların tamamı *E. faecium*'dur. Bu suşların toksin özellikleri incelendiğinde 19 izolattan 15'i (%17) *C. difficile* toksin pozitif, 4'ü (%5.7) toksin negatiftir (Tablo 11). Enterokokların 16'sı (%45,8) ise vankomisin ve teikoplanin açısından duyarlı saptanmıştır. Duyarlı saptanan kökenler, değerlendirme dışı bırakılmıştır. Toksin pozitifliğinin VRE kolonizasyonu açısından pozitif öngörü değeri (PÖD) %79, negatif öngörü değeri (NÖD) %47 olarak saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları tabloda gösterilmiştir (Tablo 12). Elde edilen sonuçlar Fischer'in kesin ki-kare testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, toksin pozitifliği ve

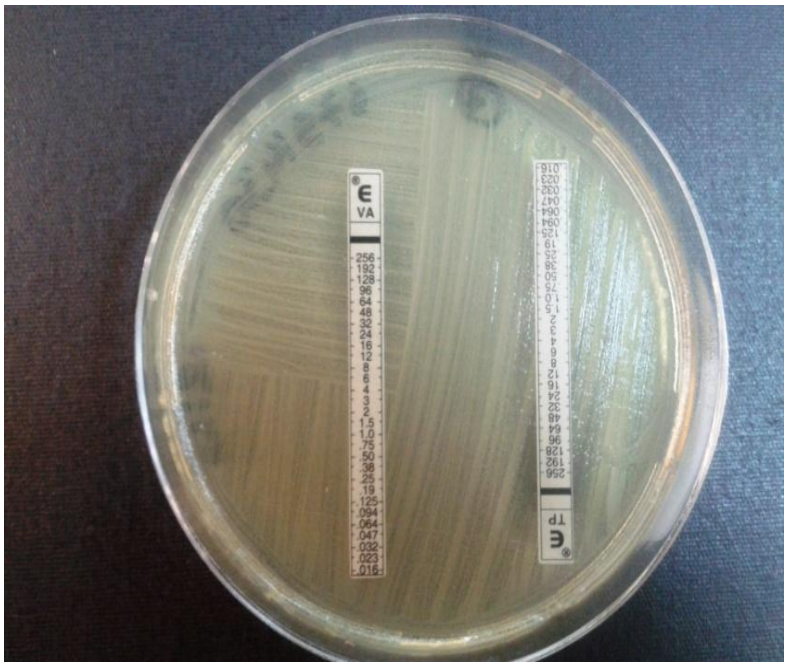
VRE pozitifliği arasındaki ilişki 0.047 ile anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Hastaların yaşları ve servisleri ile VRE pozitifliği arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Tablo 11. *C. difficile* toksin varlığı ve VRE kolonizasyonu

TOKSİN VARLIĞI	VRE POZİTİF n (%)	VRE NEGATİF n (%)	TOPLAM
TOKSİN POZİTİF	15 (17)	73 (83)	88 (100)
TOKSİN NEGATİF	4 (5.7)	66 (94.3)	70 (100)
TOPLAM	19 (12.1)	139 (87.9)	158 (100)

Tablo 12. VRE olarak saptanan *E. faecium* kökenlerinin (n:19) antibiyotik duyarlılık sonuçları

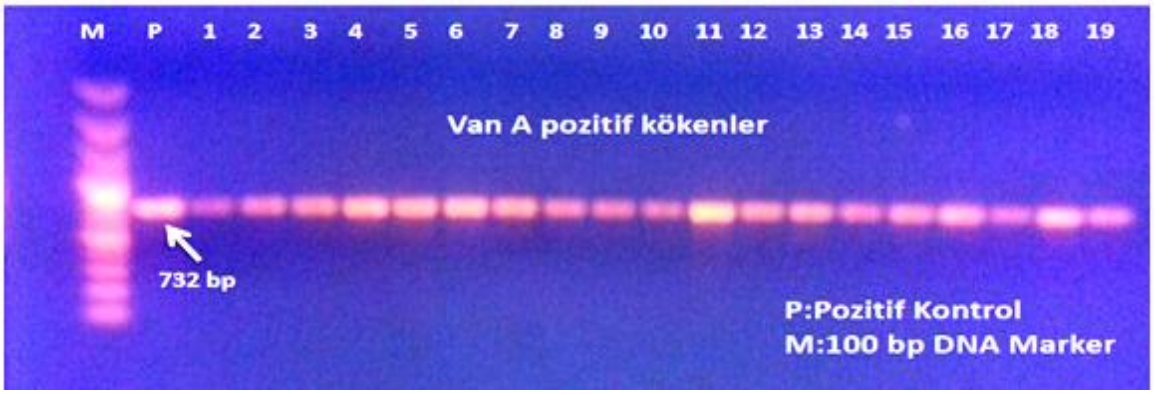
	VANKOMİSİN MİK (µg/ml)	TEİKOPLANİN MİK (µg/ml)	SERVİS/POLİKLİNİK	YAŞ	TOKSİN ÖZELLİĞİ
1	≥256	≥256	PEDİYATRİ SERVİSİ	3	POZİTİF
2	≥256	48	PEDİYATRİ SERVİSİ	2	NEGATİF
3	≥256	48	DAHİLİYE YOĞUN BAKIM SERVİSİ	71	POZİTİF
4	≥256	32	PEDİYATRİ SERVİSİ	11	NEGATİF
5	≥256	≥256	YENİDOĞAN POLİKLİNİĞİ	1	POZİTİF
6	≥256	≥256	PEDİYATRİ SERVİSİ	5	POZİTİF
7	≥256	48	ENFEKSİYON SERVİSİ	63	NEGATİF
8	≥256	96	PEDİYATRİ SERVİSİ	4	POZİTİF
9	≥256	32	DAHİLİYE YOĞUN BAKIM SERVİSİ	62	POZİTİF
10	≥256	32	YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM SERVİSİ	2 AYLIK	POZİTİF
11	≥256	≥256	ÇOCUK GASTROENTEROLOJİ POLİKLİNİĞİ	7	POZİTİF
12	≥256	≥256	ENFEKSİYON SERVİSİ	70	POZİTİF
13	≥256	≥256	DAHİLİYE SERVİSİ	59	NEGATİF
14	≥256	≥256	PEDİYATRİ YOĞUN BAKIM SERVİSİ	4	POZİTİF
15	≥256	≥256	PEDİYATRİ SERVİSİ	3	POZİTİF
16	≥256	≥256	PEDİYATRİ SERVİSİ	4	POZİTİF
17	≥256	≥256	PEDİYATRİ SERVİSİ	14	NEGATİF
18	≥256	≥256	PEDİYATRİ SERVİSİ	13	POZİTİF
19	≥256	≥256	YENİDOĞAN SERVİSİ	3 AYLIK	POZİTİF



Resim 4. Gradiyent strip vankomisin/teikoplanin duyarlılık testi görüntüsü

4.7.PZR Sonuçları

İzole edilen tüm enterokok suşlarının (n:35) tamamının PZR ile direnç genleri araştırılmıştır. Gradiyent strip yöntemi ile VRE oldukları tespit edilen 19 suşun tamamında *vanA* direnç paterni saptanmıştır (Resim 5). Ancak hiçbir suşta *vanB* genotipi gözlenmemiştir.



Resim 5. vanA pozitif VRE kökenlerinin jel elektroforez görüntüsü

4.8.Enterokokların Gradiyent Strip ve PZR Sonuçlarının Karşılaştırılması

Enterokokların vankomisin ve teikoplanine olan duyarlılıkları gradiyent strip yöntemiyle belirlenmiştir. Buna göre 35 izolatın 19'u (% 54,2) vankomisin ve teikoplanine dirençli olarak bulunmuş, hepsinin vankomisin MİK değerinin ≥256 olduğu, teikoplanin MİK değerlerinin ise 32-256 µg/mL arasında değişik düzeylerde dirence sahip olduğu görülmüştür. Çalışmaya alınan 35 izolatın tamamının PZR ile direnç genleri araştırılmış, 19'unda (%54,2) *vanA* direnç paterni saptanırken 16'sında *vanA* veya *vanB* direnç genine rastlanmamıştır. Gradiyent strip ve PZR ile elde edilen sonuçlar %100 uyumlu bulunmuştur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hastane enfeksiyonları günümüzde sıklıkla karşılaşılan en önemli sağlık sorunlarından biridir. Enterokoklar, 1970'li yıllardan beri hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında en sık izole edilen türlerden biri olarak tanımlanmaktadır. Sık görülmelerinin önemli bir nedeni birçok antibiyotiğe karşı doğal dirençli olmaları ve diğer antibiyotiklere karşı da kolaylıkla direnç kazanabilme yetenekleriyle ilişkilidir. Artışın diğer bir nedeni de enterokok kolonizasyonuna yol açabilen antibiyotiklerin profilaksi ve tedavi amaçlı sıklıkla kullanılmasıdır (1, 46, 103). Enterokok enfeksiyonlarının büyük bir kısmı nozokomiyal kaynaklıdır. Bunların çoğunluğu da yoğun bakım ünitelerinden izole edilmektedir.

E. faecium vankomisin direncinin en sık görüldüğü enterokok türüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda da, *E. faecium*'un daha sık izole edildiği görülmüştür (53). Biz de çalışmamızda bu verileri desteleyecek şekilde tanımlanan enterokok suşlarının %.91.4'ünü *E. faecium*, %8.6'sını *E. faecalis* bulduk. Ancak VRE olarak saptanan tüm kökenler *E. faecium*'du. Bizim yaptığımız ve bu konuda yapılan diğer pek çok çalışmada *E. faecium*'un *E. faecalis*'e oranla daha sık saptandığı ve VRE kolonizasyonundan sorumlu olduğu görülmüştür.

Antibiyotik kullanımı, VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonunun görülmesine zemin hazırlayan önemli bir risk faktörü olduğu için ülkemizde ve dünyada bu konuda yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (30, 42, 95, 100).

Yamane ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada, disk difüzyon yönteminin vankomisine dirençli enterokok ve vankomisine duyarlı enterokok ayrımını yapmada yetersiz kaldığını, otomotize yöntemlerin *vanA* ve *vanB* direncinin saptamada yanlış sonuçlar verdiğini, gradiyent strip ve agar tarama yönteminin en güvenilir yöntem olduğunu, eğer dirençli veya orta duyarlı bir suş saptanırsa mutlaka PZR ile *vanA*, *vanB* direnci bakılması gerektiğini bildirmişlerdir (107). Çalışmamızda vankomisin ve teikoplanin direnci gradiyent strip yöntemi ile araştırılmış ve direnç genlerini belirlemek amacıyla PZR yöntemi kullanılmıştır. Gradiyent strip ve PZR yöntemiyle sonuçlarımız %100 uyumlu saptanmıştır.

Ülkemizde ilk olarak 1998'de Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Pediyatrik Hematoloji servisinde yatan malign histiositozlu bir bebekten VRE izole edilmiştir (19). Bundan sonraki yıllarda ülkenin her yerinden giderek artan oranlarda VRE bildirilmeye başlanmıştır (5, 7, 25, 53).

VRE sıklığının artmasıyla özellikle yatan hastalarda hızlı tanımlama yapabilmek için çeşitli yöntemler geliştirilmektedir. Kromojenik besiyerleri de hem hızlı tanımlama hem de tür ayrımı yapabilmeleri nedeniyle son yıllarda gündeme gelmiştir. ChromID VRE (*bioMerieux*, Fransa) besiyeri de sadece VRE tanımlamaya yönelik, içerisinde 8 µg/mL vankomisin olan seçici bir besiyeridir. Bu besiyerinin duyarlılığını ve özgüllüğünü belirlemeye yönelik yapılmış ülkemiz ve dünyadaki pek çok çalışmada besiyerinin yüksek bir duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir (32). Ledeboer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 120 dışkı örneği chromID VRE besiyerine ekilmiş, besiyerinin *E. faecium*'u tanımlamada %85.4, *E. faecalis*'i tanımlamada ise %90 duyarlılık ve her iki tür içinde %100 özgüllüğe sahip olduğu görülmüştür (71). Diğer yapılan pek çok çalışmada besiyerinin güvenilir olduğunu desteklemektedir. Ancak bizim yaptığımız çalışmada elde edilen 35 enterokoku, besiyeri tür düzeyinde doğru tanımlamasına karşın vankomisin direnci konusunda diğer çalışmalarla uyumlu bulunmamıştır. 35 enterokok suşunun 19'u gradiyent strip yöntemiyle vankomisin ve teikoplanine dirençli bulunurken, 16 suş duyarlı saptanmıştır. Besiyeri içeriğindeki vankomisin sayesinde sadece VRE'lerin üremesine izin verip diğerlerini inhibe etmesi gerekirken bizim çalışmamızda vankomisin duyarlı kökenler %45.8 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. Bu durum dışkı florasının direkt ekiminden kaynaklı olarak, floradaki diğer elemanları baskılayabileceği ve bu nedenle duyarlı enterokoklarında üremesine ortam sağlayabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle besiyerinin VRE olarak saptadığı kökenlerinde bir antibiyotik duyarlılık testi ile değerlendirildikten sonra VRE tanısı konması gerektiği düşünülmektedir. Ancak bu durumla ilgili kesin bir yargıya varılamamıştır.

Tanımlamanın doğru ve hızlı bir şekilde yapılması ve vankomisin direncinin saptanması, VRE kolonizasyon ve enfeksiyonunun belirlenmesi için önemli bir adımdır. Dışkı kültürü VRE kolonizasyonunun belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmesine rağmen araştırmacılar rektal ve perirektal sürüntünün alınmasını da uygun bulmaktadır (32). Bizim hastanemizde rektal sürüntü örneklerinden rutin olarak VRE taraması yapılmaya devam edilmektedir. Çalışmamızda, *C. difficile* toksin pozitif ve VRE pozitif olan 19 hastanın verileri irdelendiğinde, bu hastalardan 14'inden (%73.7) aynı dönemde VRE taraması istendiği ve bunların 11'inin (%57.9) pozitif olduğu saptanmıştır. 3 (%15.7) örnekte ise rektal sürüntüde saptanmadığı, ancak çalışmamızda dışkı örneklerinden VRE saptandığı görülmüştür. Çalışmamız döneminde çeşitli servislerde yatan 3772 hastaya ait rektal sürüntü örneği gelmiş ve bunlardan 486'sından (%12.9) VRE izole edilmiştir.

VRE kolonizasyonu uzun süreli yatışların olduğu, antibiyotik kullanımının ve invazif girişimlerin fazla olduğu yoğun bakım ünitelerinde, hematoloji-onkoloji servisleri ve trasplantasyon ünitelerinde daha yüksek oranlarda görülmektedir (60). Bizim hastanemizde ise VRE kolonizasyonu sıklıkla pediyatri ve dahiliye servislerinde görülmektedir. Bu durum hem bu servislerdeki çapraz kontaminasyonun daha fazla olduğunun hem de kolonizasyonun saptanmasında daha dikkatli olunduğunun göstergesidir.

VRE yayılımını engellemek için, hastanelerde VRE ile kolonize hastaları saptamak için laboratuvar bazlı pek çok tarama yöntemi kullanılmaktadır. VRE sorunu bulunan bir merkezde periyodik prevalans taramaları yapılmadığı takdirde kontrol programının başarıya ulaşması ve enfeksiyonların tedavisi güçtür. VRE kolonizasyonunun önceden belirlenmesi tedavi seçimini yönlendirmektedir (2).

Malignite, kronik böbrek yetmezliği, nötropeni, organ transplantasyonu hastalarında daha sık görülmeleri, hastanede yatış süresinin uzunluğu, antibiyotik ve antineoplastik uygulamaları, antibiyotik tedavi süresi ve dozu VRE enfeksiyonuna yol açan önemli risk faktörleridir. *C. difficile* içinde VRE gibi benzer risk faktörleri önemlidir. *C. difficile* ve VRE arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelik ilk çalışma Gerding tarafından Amerika'da 1997 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada *C. difficile* enfeksiyonu olan hastaların tedavisinde oral vankomisin kullanımı ve VRE enfeksiyonuyla ilişkisi incelenmiş, takip edilen 18 hastanın 15'inde (%83) VRE'ye rastlanmıştır. Ancak *C. difficile* enfeksiyonunun tedavisinde diğer bir seçenek olan metronidazol kullanımında da VRE enfeksiyonu görülen hastalara rastlandığı için bu ilişkiye dair kesin bir sonuca varılamamıştır (50). Garbutt ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 215 *C. difficile* toksin çalışılan hastadan 41'inde (%19) VRE kolonizasyonu tespit edilmiştir (48). Shay ve arkadaşlarının yaptıkları diğer bir çalışmada VRE bakteriyemisi olan 46 hastanın 10'unda (%21.7) *C. difficile* enfeksiyonu da saptanmıştır (87). Jordens ve arkadaşları da *C. difficile* toksini araştırılması isteği ile gönderilen 35 hastadan 4'ünde (%11) VRE kolonizasyonu gözlemlemişlerdir (60).

Rafferty ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada *C. difficile* toksinA pozitif ve toksin negatif örneklerdeki VRE kolonizasyonu kıyaslanmış ve 3 aylık zaman diliminde gelen 79 örnekten %16.5 oranında VRE pozitifliği saptanmıştır (82).

Leber ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise *C. difficile* toksin isteği ile gelen 50 dışkı örneğini incelemeye almışlar ve bu örneklerdeki VRE kolonizasyon oranını %3.2 olarak

bulmuşlardır (70). Diğer çalışmalarda birbirine benzer sonuçlar elde edilmesine karşın Fujitani ve arkadaşlarının çalışmasında, 3 aylık dönemde *C. difficile* toksin pozitif olan 158 hastaya ait dışkı örneğinde VRE taraması yapılmış, 88 hastada VRE kolonizasyonu saptanmış ve *C. difficile* ve VRE'nin benzer risk faktörlerine sahip olduğu için *C. difficile* enfeksiyonu geçiren kişilerde VRE kolonizasyonu taraması yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. (47).

Bizim yaptığımız çalışma ülkemize ait ilk çalışmadır. Çalışmamızda toksin araştırılması isteği ile gönderilen dışkı örneklerindeki VRE oranı toksin pozitif ve toksin negatiflerde ayrı ayrı değerlendirilmiş, toksin pozitiflerdeki VRE oranı %17 saptanmıştır. Özellikle pediyatri ve dahiliye servislerindeki *C. difficile* ve VRE pozitifliği diğer servislere oranla dikkat çekicidir. Sonuçlarımız Garbutt ve Rafferty'nin çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur (48, 82). Çalışmamızda VRE sıklığı toksin negatiflerde %5.7 olarak saptanmıştır. Toksin pozitiflerdeki VRE oranının, negatiflere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). *C. difficile* ve VRE'nin benzer risk faktörlerine sahip olduğu elde ettiğimiz bulgularla desteklenmiştir.

VRE kökenlerinin hepsinde *vanA* direnç geninin görülmesi, *vanB*'ye rastlanmaması ülkemiz verileriyle uyumlu olup, hala *vanB* direncinin ender görülen bir direnç türü olduğunu doğrulamaktadır.

Çalışmamız döneminde hastanemizde VRE kolonizasyon oranı %13.2, *C. difficile* toksin pozitifliği oranı %3.8 iken, *C. difficile* toksin pozitif olanlarda VRE pozitifliği %17 olarak saptanmıştır. Bu da hastanelerde VRE taraması yapılacak hasta grubunu seçerken, *C. difficile* toksin pozitifliği saptananların seçilmesi için önemli bir veri oluşturmaktadır.

Gastrointestinal sistem VRE'ler için önemli bir kaynaktır ve yayılımın önlenmesi için erken tespiti oldukça önemlidir. Ancak her bölümde VRE taraması yapılması gereksiz iş yükü ve maliyet getirmektedir. Yoğun bakım, hematoloji-onkoloji gibi VRE açısından yüksek riskli servisler dışındaki servisler için *C. difficile* toksin pozitif kişiler gibi odağa yönelik taramalar yapılması gerek maliyet, gerekse iş yükünü azaltma açısından önemli katkı sağlayacağından VRE taraması bu servislerle sınırlandırılabilir. Bu yaklaşım, *C. difficile* toksin isteği ile laboratuvara zaten gelmiş olan örneklerden VRE saptamaya yönelik olduğundan klinik mikrobiyoloji laboratuarlarına uygulanması kolay olacaktır. Tek bir örnekle iki önemli patojenin saptanması sağlanacaktır. Bu tip pozitif saptanma olasılığı yüksek hastaların seçilmesi taramanın daha etkili olmasına yol açacaktır. Aynı zamanda hastane personelinin daha etkili kullanılmasını sağlayacak, çapraz bulaş riskini azaltacak, dolayısıyla ciddi bir maliyet etkinlik sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Aktaş G, Derbentli Ş. Vankomisine dirençli Enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. İnfeksiyon Derg. 2009; 23 (4): 201-209.
2. Al-Nassir WN, Sethi AK, Nerandzic MM, Bobulsky GS, Jump RLP, and Donskey CJ, Comparison of clinical and microbiological response to treatment of *Clostridium difficile* associated disease with metronidazole and vancomycin, Clin Infect Dis. 2008; 47, no. 1, 56–62.
3. Alp Ş, Şardan YÇ. Vankomisine dirençli enterokokların epidemiyolojisi ve kontrolü. Hacettepe Tıp Derg. 2008; 39: 89-95.
4. Al-Saif N, Brazier JS. The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. J Med Microbiol. 1996; 45 (2): 133-7.
5. Altun B, Cengiz AB, Kara A, Ceyhan M, Ünal S, Seçmeer G. First vancomycin-resistant blood isolate of *Enterococcus faecium* in a children's hospital and molecular analysis of the mechanism of resistance. Turk J Pediatr. 2008: 50 (6) : 554-8.
6. Arias CA, Contreras GA and Murray BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. Clin Microbiol and Infect. 2010; 16(6): 555-562.
7. Aygün H, Memikoğlu OK, Tekeli A, Azap A, Yörük F. Hastanede Yatan Riskli Hasta Gruplarında Vankomisine Dirençli Enterokok Kolonizasyonunun Sürveyansı. Türk Anest Rean Der. 2008; 36: 168-173.
8. Barbutt F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile* associated infections. Clin Microbiol Infect. 2001; 7: 405-10.
9. Bartlett JG. Pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated colitis. In Gastro and Liver Dis (ed) Sleisenger, Fordtran. WB Saunders Company, Philadelphia 1998; 1633-46.
10. Bartlett JG. Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C.difficile* infection. Clin Infect Dis. 2008; 46: S4-11.
11. Berzeg D. Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnci, Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci ve E test ile Vankomisin MİK Değerlerinin Değerlendirilmesi. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul 2005.

12. Bilgehan H. *Clostridium difficile* In: Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji-Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 9. Basım, İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 1995: 361-363.
13. Bilgehan H. D Grubu Streptekoklar. In: Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji Tanı. 4. Baskı, İzmir: Barış Yayınları, 2000: 510.
14. Bignardi GE. Risk factors of *Clostridium difficile* infection. J Hospital Infect. 1998; 40: 1-15.
15. Bilström H. Molecular epidemiology of clinical *E.faecium*. Carolinska İnstitutet. Thesis 2008.
16. Brazier JS. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. J Antimicrob Chemother. 1998; 41; 29-40.
17. Boyce JM: Vancomycin-resistant Enterococcus: Detection, epidemiology, and control measures, Infect Dis Clin North Am. 1997; 11: 367-384.
18. Burke JP, Yeo TW. Nosocomial Urinary Tract Infections. Mayhall C G (ed). Hospital Epidemiol and Infect Control. Third edition. Lippincott Williams-Wilkins, Philadelphia. 2004: 267-286.
19. Celkan T, Apak H, Özkan A, Özer Y, Diren Ş, Yıldız İ. Bir Hematoloji Servisinde Vankomisine Dirençli Enterokok ve Sepsis Kolonizasyonu. Ankem Derg. 2004; 18(3): 176-179.
20. Cerquetti M, Biol D, Luzzi I, Caprioli A, Sebastianelli A, et al. Role of *Clostridium difficile* in childhood diarrhea. Pediatr Infect Dis J. 1995; 14: 598-603.v
21. Charles MAP, Franz AB, Silberhorn M, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel HW. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among *Enterococci* Isolated from Food. App and Environment Microbiol. 2001; 67: 4385-4389.
22. Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. J Hosp Infect. 2003; 53: 159-71.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, CLSI Document M100-S20, Wayne, PA (2010).
24. Courvalin P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. Clin Infect Dis. 2006; 42: 25–34.

25. Cömert FB, Kulah C, Aktas E. First Isolation of Vancomycin-Resistant Enterococci and Spread of a Single Clone in a University Hospital in Northwestern Turkey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007; 57-61.
26. Cunha BA, Mickail N, Eisenstein L. E. faecalis vancomycin-sensitive enterococcal bacteremia unresponsive to a vancomycin tolerant strain successfully treated with high-dose daptomycin. Heart Lung. 2007; 36 (6) : 456-461.
27. Çalangu S. : Hastane Epidemilerinin Önlenmesi ve Kontrolü: ANKEM Derg. 2004; 18: 104-108.
28. Çaylan R. Antibiyotikle İlişkili İshaller. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. Cilt 2, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2008: 1060-1064.
29. Çelebi S. Vankomisin Dirençli Enterokoklar ve Tedavisi. Güncel Pediatr Derg. 2008; 3 (6): 182-186.
30. Çelik Ü, Alhan E. Pediatrik Enfeksiyonlarda Zorlu Patojen: Enterokoklar. J Pediatr Infect. 2008; 2: 58-66.
31. Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clin Microbiol Rev. 2000; 13: 686-707.
32. D'Agata EM, Gautam S, Green WK, Tang YW. High rate of false-negative results of the rectal swab culture method in detection of gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis 2002; 34 (2) : 167-72.
33. Delmas, J. , F. Robin, C. Schweitzer, O. Lesens, and R. Bonnet. Evaluation of a new chromogenic medium, chromID VRE, for detection of vancomycin-resistant enterococci in stool samples and rectal swabs. J. Clin. Microbiol. 2007; 45: 2731–2733.
34. Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesinde Yatan İshalli Hastalardan İzole Edilen *Clostridium difficile* Kökenlerinde Toksin Genlerinin Araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2011; 45 (1) : 1-10.
35. Devriese L, Baele M, Butaye P. The Genus Enteroccus: Taxonomy, Prokaryotes. 2006; 4: 163-174.
36. Durmaz G. Enterokoklar. Topçu A.W, Söyletir G ve Doğanay M (ed). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. 2008: 2057-2065.

37. Dutka-Malen, S. Evers, and P. Courvalin. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 24–27. 6.
38. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: Risk factors for infection. Clin Infect Dis. 1995; 20: 1126-1133.
39. Eliopoulos GM: Vancomycin-resistant enterococci: Mechanism and clinical relevance, Infect Dis Clin North Am. 1997; 11: 851-865.
40. Elizaga M, Weinstein R and Hayden M. Patients in Long-Term Care Facilities: A Reservoir for Vancomycin-Resistant Enterococci. Clin Infect Dis. 2002; 34: 441–446.
41. Ertek M, Yazgı H, Akta E, Erol S, Yaran M. Vankomisine Dirençli Enterokok Araştırılması ve Diğer Antimikrobiyallere Duyarlılıkları. İnfeksiyon Derg. 2003; 17(4): 447-451.
42. Facklam RR, Washington JA. *Streptococcus* and related catalase negative gram positive cocci. In: Ballows A, Hausler WJ. Manual of Clinical Microbiology. 5th edition, Washington DC: American Soc for Microbiol Pub. 1991; 238-257.
43. Fekety R. Guidelines tor the diagnosis and management of *Clostridium difficile* associated diarrhea and colitis. Am J Gastroenterol. 1997, 92: 7. 39-50.
44. Finney, J. M. T. Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. John Hopkins Med J. 1883, 4, 53–5.
45. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiol. 2009; 155: 1749–1757.
46. French GL. Enterococci and Vancomycin Resistance. Clin Infect Dis. 1998; 27: 75–83.
47. Fujitani S, George WL, Morgan MA, Nichols S, Murthy AR. Implications for vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization associated with *Clostridium difficile* infections. Am J Infect Control. 2011 Apr; 39 (3) : 188-93.
48. Garbutt JM, Littenberg B, Evanoff BA, Sahm D, Mundy LM, . Enteric carriage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in patients tested for *Clostridium difficile*. Infect Control Hosp Epidemiol. 1999; 20: 664-670.
49. Gazi H, Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Ecem T, Özbakkaloğlu B. Hastane Kökenli *E.faecium* ve *E.faecalis* Suşlarında Antimikrobiyal Direnç. Ankem Derg. 2009; 18 (1) : 49-52.

50. Gerding DN. Is there a relationship between vancomycin-resistant enterococcal infection and *Clostridium difficile* infection? Clin Infect Dis. 1997; 25 (suppl 2) : S206-S210.
51. Gorschluter M, Glasmacher A, Hahn C, et al. *Clostridium difficile* infection in patients with neutropenia. Clin Infect Dis. 2001; 33: 786-91.
52. Graham NC, Bartley EO. Some observations on the classification of enterococci. J Hyg (Lond). 1939; 39 (5) : 538-52
53. Güdücüoğlu H, Aktaş E, Beğendik F ve ark. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Pediatri Servisinde vankomisin dirençli enterokokların ilk izolasyonu ve çoğul klonların tespiti. Mikrobiyol Bul. 2009; 43 (4) : 535-43.
54. Gültekin M. Enterokoklar: Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenez. Gram Pozitif Bakteri enfeksiyonları. Ankara 2004: 121-140.
55. Gündeş S.G. Wilke A, Karadenizli A. Ateş B. , Kocaeli Üniversitesi Hastanesi'nde İlk Vankomisine Dirençli Enterokok İzolasyonunu Takiben Yapılan Nokta Prevalansı Çalışması Sonuçları Klimik Derg. 2002; 15: 78-81.
56. Hayden M.K. Insights into the Epidemiology and Control of Infection with Vancomycin-Resistant Enterococci. Clin Infect Dis. 2000; 1058-1065.
57. Hijazi N, Elmanama AA, Al-Hindi A. Vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and non-hospitalized individuals in Gaza City. J Public Health. 2009; 17: 243-249.
58. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9th Ed. Baltimore: Williams&Willkins; 1994.
59. Joels C. Clinical Characteristics and Outcomes of Surgical Patients with Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. Am Surg. 2003; 69: 514-519.
60. Jordens JZ, Bates J, Griffiths DT. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother. 1994; 34: 515–28.
61. Kaçmaz B, Aksoy A. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. Int J of Antimicrob Agents. 2005; 25: 535–538.
62. Kandler O, Schleifer KH, Kandl R. Differentiation of *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder and *Streptococcus faecium* Orla-Jensen based on amino acid composition of their murein. J Bacteriol. 1968; 96 (6) : 1935-9.

63. Kathryn L, Ruoff Lorena M, Margaret J, Murtagh, Jean Dmary Jane Ferraro. Species Identities of Enterococci Isolated from Clinical Specimens. J Clin Microbiol. 1990; 28(3): 435-437.
64. Kayaoğlu G, Orstavik D. Vırulence Factors of *Enterococcus faecalıs*: Relatıonshıp To Endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004*;* 15: 308-320.
65. Kıyan M. Anaerop, Sporlu, Gram Pozitif Basiller. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 645-649.
66. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. International J Food Microbiol. 2003; 88: 269–290.
67. Kolar M, Vagnerova I, Pantucek R, Cermak P. Impact of rational antibiotic usage on occurance of vancomycin-resistant enterococci in hematological patient. Clin Microbial Infect. 2001; 7: 91.
68. Koneman E. W. , Allen S. D. , Janda W. M. Screckenberger P. C. , Winn W. C. The gram positive cocci part 2: Streptococci and streptococcus-like bacteria. Diag. Microbiol. 4th edition. Philadelphia: J. B. Lippincott Company; 1992: 431-66.
69. Korten V: Enterokoklar. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi, 2002; 1497–1506.
70. Leber AL, Hindler JF, Kato EO, Bruckner DA, Pegues DA. Laboratory based surveillance for vancomicin-resistant enterococci: utility of screening stool specimens submitted for *Clostridium difficile* toxin assay. Infect Control Hosp Epidemiol. 2001; 22: 160-164.
71. Ledeboer NA, Das K, Eveland M et al: A new chromogenic agar medium, chromID VRE, to screen for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 59: (4) : 477-9
72. Mc Bee, R.H. Intestinal flora of some antarctic birds and mammals. J Bacteriol. 1960; 79: 311-312.
73. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev 1990; 3: 46-65.
74. Murray BE. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. Emerging Infect Dis. 1998; 4: 37-47.
75. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Clostridium difficile*. In: Başustaoğlu AC. Tıbbi Mikrobiyoloji. 6. Baskı, Ankara: Atlas Kitapçılık, 2010: 377-389.

76. Muto C.A, Jernigan J.A. SHEA Guideline for Preventing Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant Strains of Staphylococcus aureus and Enterococcus. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003;24: 362-386.
77. Öngen B, Gürler N, Esen F, Karayay S, Töreci K. Glikopeptidlere ve denendiği bütün antibiyotiklere dirençli *Enterococcus faecium* suşu. Ankem Derg. 1999; 13: 501-505.
78. Özcan A, Naas T, Baysan B. Nosocomial Outbreak of Vancomycin Resistance E.faecium in a Çocukc Unit at a Turkısh University Hospital. J Antimicrob Chemother. 2008; 61: 1033-1039.
79. Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. J Antimicrob Chemother. 2003; 51: 13–21.
80. Persson S, Torpdahl M, Olsen K E P. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA / cdtB) genes applied to a Danish strain collection. Clin Microbiol Infect. 2008; 14: 1057-64.
81. Poxton I.R, McCoubrey J, Blair G. The pathogenicity of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect. 2001; 7: 421-427.
82. Rafferty ME, McCormick MI, Bopp LH, Baltch AL, George M, Smith RP, et al. Vancomycin-resistant enterococci in stool specimens submitted for *Clostridium difficile* cytotoxin assay. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997; 18: 342-344
83. Recommendations for Preventing the Spread of Vancomycin Resistance Recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC).Recomm. and Rep.1995; 44: 1-13.
84. Robert C, Moellering RC. Enterococcus species bovis and Leuconostoc species. Principles and Practise of Infectious Disease 5th edition. Churchill-Livingstone; 2000; 2147-53
85. Robert C, Moellering RC. Enterococcus species, Streptococcus bovis and Leuconostoc spesies. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (edc). Principles and Practice of Infect Dis. Vol 2. Sixth edition. Elsevier Churchill Livingstone 2005: 2411-2417.
86. Seville MT, Carey RB, O'Keefe JP. Vancomycin-resistant enterococcus (VRE) infections and the prevalence of VRE in patients suspected to have *Clostridium difficile* diarrhea (CDD) [abstract no J75]. In: Program and abstracts of the 35th

Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemother (San Francisco). Washington, DC: American Soc for Microbiol. 1995.

87. Shay DK, Maloney SA, Montecalvo M, et al. Epidemiology and mortality risk of vancomycin resistant enterococcal bloodstream infections. J Infect Dis. 1995; 172: 993,–1000.
88. Sıngh N, Sleemi A, Pıkıs A. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Colonization in Children. J Clin Microbiol. 1999; 413-416.
89. Snyder M.L. Further studies on *Bacillus difficilis.* J Infect Dis. 1937; 60: 223-231
90. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. Indian J Med Res. 128, 2008; 111-121.
91. Song J.H.Clinical implications of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) with VanD phenotype and vanA genotype. J Antimicrob Chemother. 2008; 61: 838–844
92. Spencer R.C. The role of antimicrobial agents in the aetiology of *Clostridium difficile*-associated disease. J Antimicrob Chemother. 1998;41 (Suppl. C) : 21-27
93. Summanen P, Baron E. J, Citron D. Mi et al. Laboratory tests for diagnosis of *Clostridium difficile* enteric disease. "Wadsworth Anaerob Bacteriol Manual". 5th Edition, pp. 133-141, Star Publishing Company, California, USA, 1993.
94. Şekercioğlu AO, Vural T, Çolak D, Öğünç D, Öngüt G. "Kan Kültürlerinden İzole edilen Enterokok Türlerinin Antibiyotik Duyarlılık ve Yüksek Düzey Gentamisin Dirençliliklerinin Saptanması". Ankem Derg. 1998; 12 (2) : 114.
95. Tacconelli E. , M Cataldo M. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. Intern J Antimicrob Agents 31: 2008; 99–106.
96. Taşova Y, İnal S. Enterokok infeksiyonlarında klinik. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar, İnfeksiyon Derg. 2004; 17-22.
97. Tedesco F. J, Barton R.W. and Alpers D.H. Clindamycin-associated colitis. A prospective study. Ann Intern Med. 1974; 81: 429-433.
98. Teixeira LM, Carvalho MGS, Facklam RR. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual Clin Microbiol (9th ed) ASM Press, Washington DC 2007, pp. 430-442.
99. Torun MM, Bahar H, Altınkum S, Yüksel P. Enterokoklarda Yüksek Düzey Aminoglikozit ve Vankomisin Direnci Araştırılması. Ankem Derg. 1999; 13 (2) : 105.

100. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji ve Patogenez. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004: 121-185.

101. Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umapathy BL. Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. Indian J Med Microbiol. 2009; 27: 301-305.

102. Ural O. Nozokomiyal Enterokok Bakteriyemisi. Hastane İnfeksiyonları Derg. 1998; 2: 217-223

103. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 1988; 1(8575-6) : 57-8

104. Uzunismail H. *Clostridium difficile* Diyaresi. Endoskop Derg. 1998; 9 (3) : 105-109

105. Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, David R at al. Association between the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin, and Enterococcal Surface Protein and Mortality among Patients with Bacteremia Due to *Enterococcus faecalis.* Clin Infect Dis. 2002; 35: 570–575.

106. Vidya MV, Diaz JG, Islam T, Hasbun R. Vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: is daptomycin as effective as linezolid. J Antimicrob Chemother. 2009; 64: 175–180.

107. Yamane N, Miyagama S, Nokasone I, et al. "Laboratory evaluation of antimicrobial susceptibility testing to detect VRE. J Clin Pathol. Jpn 1997; 45: 381-390.

108. Yazgı H. , Ertek M, Uslu H, Kadanalı A. Enterokoklarda Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci ile Beta Laktamaz Üretimi İlişkisi. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2003; 33: 333-336.

109. Yıldırım M. Enterokoklar ve Enterokoklarla Gelişen Enfeksiyonlar. Düzce Üni Tıp Fak Derg. 2007; 2: 46-52.

110. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Scheckenberger P, Woods G. The Anaerobic bacteria. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnos Microbiol. 5th Edition, pp. 767-784, Lippincott Williams& Wilkins, Philadelphia, USA, 1997.

111. Zeana C, Kubin CJ, Della-Latta P, Hammer SM. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* meningitis successfully managed with linezolid: case report and rev of the lit. 2001; 33 (4) : 477-82.

112. Zırakzadeh A, Patel R. Vancomycin-Resistant Enterococci: Colonization, Infection, Detection, and Treatment. Mayo Clin Proc. 2006; 81 (4) : 529-53.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

PROJENİN ADI: Clostridium Difficile Toksini Araştırılması İsteği ile Gönderilen Dışkı Örneklerindeki Vankomisin Dirençli Enterokok(VRE) Kolonizasyonunun Saptanması
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Doç. Dr. Z.Arzu İLKİ
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Sevim ÖZSOY
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 16.11.2012-4

Sayın Doç. Dr. Z.Arzu İLKİ

128 protokol nolu "Clostridium Difficile Toksini Araştırılması İsteği İle Gönderilen Dışkı Örneklerindeki Vankomisin Dirençli Enterokok(VRE) Kolonizasyonunun Saptanması" isimli projeniz Enstitümüzün Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Komisyon Başkanı

Doç. Dr. Serap ŞİRVANCI
Komisyon Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Doç. Dr. Levent KABASAKAL

Prof. Dr. Aysel PEHLİVAN

Doç. Dr. Nefise BAHÇECİK

Doç. Dr. Oğuzhan DEYNELİ

Doç. Dr. Asım CİNGİ

Doç. Dr. Pınar AY

Yrd. Doç. Dr. Murat ÇEKİN

Yrd. Doç. Dr. Zübeyir SARI

Öğr. Gör. Dr. Tolga GÜVEN

Marmara Üniversitesi Göztepe Kampüsü Sağlık Bilimleri Enstitüsü 34688 Kadıköy / İSTANBUL
0 (216) 414 44 23/12 (Faks)
0 (216) 414 44 23
Ayrıntılı bilgi için:
saglik.ogrenci@marmara.edu.tr
http://saglik.marmara.edu.tr

Ek.2. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

Çalışma Adı: *Clostridium difficile* toksin isteği ile gelen dışkı örneklerindeki vankomisin dirençli enterokok (VRE) kolonizasyonunun saptanması

Protokol No: Yüksek lisans tez projesi

Sayın……..

Antibiyotik sonrası gelişen ishallerden en sıklıkla *Clostridium difficile (C. difficile)* toksini sorumludur. Antibiyotik kullanım öyküsü olan bu hastalar bu mikrobun yanısıra, barsaklarında bazı antibiyotiklere dirençli mikroplar da taşıyabilirler. Bunların başında vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) gelmektedir. Bu çalışmada klinikteki doktorunuzun, *C. difficile* aramak için laboratuvara gönderdiği dışkı örneğinizde VRE olup, olmadığı araştırılacaktır.

Şikâyetiniz nedeniyle başvurduğunuz klinikte sizden alınan dışkı örneğinden çalışma yapılacaktır. Sizden çalışmayla ilgili hiçbir ücret talep edilmeyecek ve herhangi bir ek girişim yapılmayacaktır. Alınan örnekler bu çalışma dışımda başka bir çalışmada kullanılmayacaktır.

Çalışmaya katılmanız halinde kişisel bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacak, olup, çalışma ile ilgili danışmak istediğiniz bir konu olduğunda aşağıda telefon numarası bulunan araştırmacıyla temasa geçebilirsiniz.

Bu çalışmaya herhangi bir etki veya baskı altında kalmadan gönüllü olarak katılmanızı istiyoruz. İstediğiniz her an çalışmadan çekilme hakkına sahipsiniz. İsminiz kesinlikle gizli tutulacaktır.

Hasta Adı Soyadı:
Tarih:
İmza:
AraştırıcınınAdı Soyadı:
Cep tel no.
Tarih:
İmza:

Çalışma Adı: *Clostridium difficile* toksin isteği ile gelen dışkı örneklerindeki vankomisin dirençli enterokok (VRE) kolonizasyonunun saptanması

Protokol No: Yüksek lisans tez projesi

Hasta bilgilendirme formunda verilen tüm bilgileri okudum ve anladım. Şikayetim nedeni ile ttkik için alınan dışkı örneklerinin bir kısmının bu çalışmada araştırma amacıyla kullanılmasında bir sakınca görmüyorum. Bu çalışmaya hiç kimsenin etkisi altında kalmadan tamamen kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Hasta Adı Soyadı:
İmza:
Tarih:

EK.3. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Sevim	**Soyadı**	Özsoy
Doğum Yeri	Uzunköprü	**Doğum Tarihi**	06.03.1988
Uyruğu	T.C.	**TC Kimlik No**	15940973840
E-mail	sevim_ozsoy@hotmail.com	**Tel**	0 536 564 73 01

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst./ Klinik Mikrobiyoloji	2014
Lisans	Trakya Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Uzunköprü Yabancı Dil Ağırlıklı Lise	2006

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1. Biyolog	Marmara Üni. Eğitim Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Lab.	2014-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	78		

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office programları	Çok İyi