

Hastane kaynaklı enterokok izolatlarının pulsed-field jel elektroforezis yöntemiyle moleküler tiplendirilmesi

Molecular typing of nosocomial enterococci by pulsed-field gel electrophoresis

Dilek GÜLDEMİR¹, Alper KARAGÖZ¹, Tuba DAL², Alicem TEKİN³, Tuncer ÖZEKİNCİ³, Rıza DURMAZ¹

ÖZET

Amaç: Enterokoklar hastaneden kaynaklanan üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının ikinci, bakteriyemilerin ise üçüncü en sık nedenidir. Günümüzde, özellikle vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşları nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olarak morbidite, mortalite ve tedavi maliyetlerini artıran önemli patojenlerdir. Hastane kaynaklı VRE salgınlarnın önlenmesi, kontrolü ve epidemiyolojik analizlerinin yapılması son derece önem taşımaktadır. Pulsed-field jel elektroforezis (PFGE) yöntemi enterokokal enfeksiyonların moleküler epidemiyolojik analizinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmanın amacı, hastane kaynaklı enterokok izolatları arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek ve olası çapraz bulaşı ortaya koymaktır.

Yöntem: Kasım 2010 - Haziran 2012 tarihleri arasında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi (DÜTF) Hastanesinin çeşitli kliniklerinde yatan ve hastane kaynaklı enfeksiyon tanısı alan hastalardan izole edilen 36 enterokok suş çalışıldı. 36 suşun 18'i idrar, altısı kan, beşi bronkoalveolar lavaj (BAL), beşi yara, biri vajinal sürüntü ve biri ise kataterden izole edilmiş olup, dokuzu VRE olarak tanımlanmıştır. İzolasyon ve tanımlanan DÜTF Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Tanımlama için

ABSTRACT

Objective: Enterococci are the second most common cause of nosocomial urinary tract and wound infections, also third most common cause of nosocomial bacteremia. Currently, especially vancomycin-resistant enterococci (VRE) are one of the significant pathogens that cause nosocomial infections and increase mortality, morbidity, and healthcare costs. Therefore prevention and control of the nosocomial VRE outbreaks and epidemiological analysis of the infection are important. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) is accepted as a "gold standard" method in the molecular epidemiological analysis of enterococcal infections. The aims of this study are to determine the clonal relationship among the nosocomial enterococcal isolates and the rate of cross-contamination between them.

Method: Thirty-six *Enterococcus* strains isolated from hospitalized patients with nosocomial infection in different clinics of Dicle University Hospital between November 2010 and June 2012 were included in this study. A total of 36 isolates were obtained from various clinical samples including urine (n=18), blood (n=6), bronchoalveolar lavage (BAL) fluid (n=5), wound biopsy sample (n=5), vaginal smear (n=1) and catheter tip (n=1). Nine of the thirty-six isolates were VRE. Isolation and identification of the isolates were conducted in the

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, ANKARA

² Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, ANKARA

³ Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, DİYARBAKIR



İletişim / Corresponding Author : Dilek GÜLDEMİR

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı, ANKARA

Tel : +90 312 565 5449

E-posta / E-mail : dilekg06@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received : 02.10.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 04.12.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.94695

Güldemir D, Karagöz A, Dal T, Tekin A, Özekinci T, Durmaz R. Hastane kaynaklı enterokok izolatlarının pulsed-field jel elektroforezis yöntemiyle moleküler tiplendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(1): 1-10.

konvansiyonel yöntemler ve BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, MD, USA) tam otomatik mikrobiyoloji sistemi kullanıldı. *Enterococcus* spp. suşlarının tam otomatik mikrobiyoloji sistemi ile Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü (CLSI) önerilerine uygun olarak antibiyotik duyarlılıkları belirlendi. İzolatların vankomisin duyarlılıkları E-test yöntemi ile de çalışıldı. Kalite kontrolü için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı. Enterokok izolatları aralarındaki çapraz bulaş oranlarını belirlemek için PFGE çalışıldı. PFGE çalışması Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Kromozomal DNA; SmaI enzimi ile kesildi. DNA restriksiyon fragmanları CHEF DR II (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) sistemi kullanılarak gösterildi. İzolatlar arasındaki klonal ilişki, BioNumerics Software Program (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak oluşturulan dendrogram ile değerlendirildi.

Bulgular: PFGE yöntemiyle izolatların DNA fragment paternleri elde edildi ve bu paternlerin dendrogramı yapıldı. DNA paternlerinin birebir karşılaştırılması sonucu 26 *Enterococcus faecium* suşunun dört küme ve bir ana grup, 10 *Enterococcus faecalis* suşunun ise üç küme ve bir majör grup oluşturduğu saptandı. 26 *E. faecium* izolatının, %97 benzerlikle ortak aynı grupta yer aldıkları görüldü. Kümeleşme oranı %77 (20/26) olup, kümelerin 2-14 arasında suş içerdiği belirlendi.

Sonuç: Bu çalışmada, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde "Kasım 2010 - Haziran 2012" tarihleri arasında hastane kaynaklı enfeksiyona neden olan enterokok suşları arasında çapraz bulaş oranının yüksek olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları, enfeksiyon kontrol programlarının daha etkin biçimde uygulanmasının önemini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Enterokok, pulsed-field jel elektroforezis, hastane enfeksiyonları klonal ilişki

bacteriology laboratories of Dicle University Medical Faculty, Department of Medical Microbiology. The conventional methods and BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, MD, USA) fully automated microbiology system were used for the identification. Antimicrobial susceptibilities of enterococcal strains were determined by a fully automated microbiology system according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). In addition, vancomycin susceptibilities of the isolates were performed by E-test method. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain was used for quality control. PFGE was studied for determining of rate of cross-contamination. PFGE was performed in National Molecular Microbiology Reference Laboratory, Public Health Institution of Turkey (PHIT). DNA restriction fragments were obtained by cutting bacterial DNA with the SmaI enzyme. DNA restriction fragments were used by CHEF DR II (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) system. PFGE results were evaluated by Bionumerics software system (version 6.01; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

Results: DNA patterns of the isolates were obtained by PFGE, and dendrogram of DNA patterns were made. Comparison of DNA patterns obtained by PFGE showed that 26 *E. faecium* strains were divided into four different clusters and one major group, 10 *E. faecalis* strains were three clusters and one major group. Twenty-six *Enterococcus faecium* isolates were involved in a joint cluster (97% similarity). The cluster rate was found to be 77% (20/26), number of *E. faecium* strains in each cluster ranged from 2 to 14 strains.

Conclusion: In this study, cross-contamination was highlighted among enterococcal strains causing nosocomial infections in Dicle University Hospital between November 2010 and June 2012. Our data revealed that more effective infection control programs should be implemented to prevent cross-transmission.

Key Words: *Enterococcus*, pulsed-field gel electrophoresis, nosocomial infections, clonal relationship

GİRİŞ

Gastrointestinal sistem ve safra yollarının normal florasında bulunan, düşük oranda da olsa vajen ve erkek üretrasında görülebilen enterokoklar, antimikrobiyal ajanlara dirençli

olmaları nedeniyle son yıllarda önemli enfeksiyon hastalıkları etkenlerindedir (1-3). Enterokok türleri; komplike üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, intra-abdominal ve pelvik enfeksiyonlar,

yara ve yumuşak doku enfeksiyonları, neonatal sepsis ve nadiren menenjitte yol açabilmesinin yanı sıra, nozokomiyal bakteremilerin üçüncü, nozokomiyal üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının ise ikinci sıklıkta saptanan etkenleridirler (1, 4). Ayrıca virülansı düşük olmasına rağmen penisilinlere ve çoğu sefalosporinlere dirençli olması, yüksek düzey aminoglikozit direnci kazanabilmesi ve günümüzde karşımıza çıkan kazanılmış glikopeptit (vankomisin ve teikoplanin) direnci nedeniyle enterokoklar geniş spektrumlu antimikrobik kemoterapi alan hastalar arasında ciddi enfeksiyonlara da neden olmaktadır (1, 5). Özellikle vankomisin rezistans enterokok (VRE) suşları nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olarak morbidite, mortalite ve tedavi maliyetlerini artıran önemli patojenlerdir (6-8).

İnsanlarda klinik örneklerden en sık (%80-90) izole edilen enterokok türü *Enterococcus faecalis*'tir. İkinci sıklıkta (%5-10) karşımıza çıkan izolat *Enterococcus faecium*'dur. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda ise oranlar tersine dönmüş olup en sık karşılaşılan tür *E. faecium*'dur. Diğer enterokokal türler ise nadiren izole edilmektedir (1, 9).

İlk vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşları 1988 yılında İngiltere ve Fransa'dan bildirilmiştir (10, 11). Daha sonraki yıllarda dünyanın birçok bölgesinden VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu bildirimleri olmuştur (12, 13). Ülkemizde de 1998 yılındaki ilk klinik izolatı takiben artan sayıda bildirimler yapılmıştır (14, 15).

Hastane kaynaklı VRE salgınlarını kontrol altına almak ve yayılmasını engellemek için hastaneye yatan intestinal VRE taşıyıcıları erkenden saptanmalı ve suşların salgın ile ilişkisi gösterilmelidir. Salgın suşları arasındaki ilişkinin belirlenmesi önceleri fenotipe dayalı yöntemlerle gerçekleştirilirken, düşük tekrarlanabilirlik, zayıf ayırım gücü, pahalı ve zaman alıcı olmaları gibi dezavantajları sebebi ile bu yöntemler yerlerini yüksek ayırım gücüne sahip, yüksek tekrarlanabilirlik özelliği gösteren

moleküler yöntemlere bırakmışlardır. Rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD), multilokus sekans tiplleme (MLST) ve pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) gibi genotipe dayalı moleküler yöntemler sık kullanılmaktadır (16-19). Salgın suşları arasındaki ilişkinin saptanması ve kaynağın belirlenmesinde, ayırım gücü en yüksek olan PFGE yöntemi; yararlı ve güvenilir bir genotiplleme yöntemidir ve "altın standart" kabul edilmektedir (20, 21).

Enterococcus spp. türleri özellikle de VRE suşları intestinal kolonizasyon ve çevre kontaminasyonu, hastane çalışanlarından veya hastadan hastaya temas yoluyla kolayca yayılabilmektedirler. Hastane kaynaklı salgınların önlenmesi için enfeksiyon kaynağının ve yayılma yollarının belirlenmesi ve belirli aralıklarla kontrol edilmesi gerekmektedir (22). Bu çalışmada; pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ile hastane kaynaklı *Enterococcus* spp. izolatları arasındaki klonal ilişki ve çapraz bulaş oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örneklerin toplanması

Bu çalışmaya, Kasım 2010 - Haziran 2012 tarihleri arasında DÜTF Hastanesinin çeşitli servislerinde yatan ve hastane kaynaklı enfeksiyon tanısı alan hastalar dahil edilmiştir. Bu dönemde, hastalardan alınan çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının sayısı 36 olarak değerlendirilmiştir. Hastane kaynaklı enfeksiyonlar, ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) kriterleri dikkate alınarak tanımlanmıştır (23). Her hastaya ait aynı ve/veya farklı klinik örneklerden elde edilen tek bir izolat çalışmaya alınmış olup, aynı hastaya ait birden fazla örnekten enterokok izole edilmesi durumunda kan izolatı tercih edilmiştir. Her hasta için; yaş, cinsiyet, yattığı servis, klinik örnek tipi, izole edilen enterokok türü ve ilk izolasyon tarihi kaydedilmiştir.

Örneklerin izolasyonu ve tanımlanması

Hastane kaynaklı enfeksiyon gelişen hastaların çeşitli klinik örneklerinden rutin mikrobiyolojik tanı testleri ile ilk bakteri izolasyonları yapılmıştır. Gram pozitif izolatlar geleneksel yöntemler (10 ve 45 °C'de üreme, %6,5 NaCl'de üreme, pH 9,6'da üreme, %40 safralı ortamda eskülünü hidrolize etme, PYR üretimi vb.) ve BD Phoenix™ 100 (Becton Dickinson, MD, USA) tam otomatik mikrobiyoloji sistemi ile tanımlanmıştır. *Enterococcus* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıkları tam otomatik mikrobiyoloji sistemi ile Klinik Laboratuvar ve Standartlar Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)'nin önerilerine uygun olarak belirlenmiştir. Ayrıca, izolatların vankomisin duyarlılıkları E-test yöntemi ile de çalışılmıştır. Bu amaçla kültür besiyeri olarak Mueller-Hinton agar (Oxoid) ve üzerinde vankomisin konsantrasyonu gradienti (0,016-256 µg/mL) bulunan E-test şeritleri (BioMerieux) kullanılmıştır. Suşların %5 koyun kanlı agardaki kültüründen elde edilen saf kolonilerden steril serum fizyolojik içinde 0,5 McFarland bulanıklık standardına eşdeğer yoğunlukta hazırlanan doğrudan koloni süspansiyonları Mueller-Hinton agar yüzeyine yayılarak inoküle edilmiştir. Yüzeyine E-test şeritleri yerleştirilen plaklar 35±2 °C'de aerobik atmosfer koşullarında 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası CLSI kriterlerine göre vankomisin için minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri; ≥2 µg/mL ise duyarlı, 4-8 µg/mL ise orta duyarlı, ≤16 µg/mL ise dirençli olarak kabul edilmiştir. Kullanılan yöntemlerin kalite kontrolünü yapmak amacıyla standart suş olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kullanılmıştır.

Pulsed Field Jel Elektroforezis (PFGE)

Enterokok suşları arasındaki çapraz bulaş oranlarını belirlemek için PFGE kullanılmıştır. PFGE çalışması Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, Mulvey ve ark.'nın (24), optimize ettikleri PFGE protokolü uygulanmıştır.

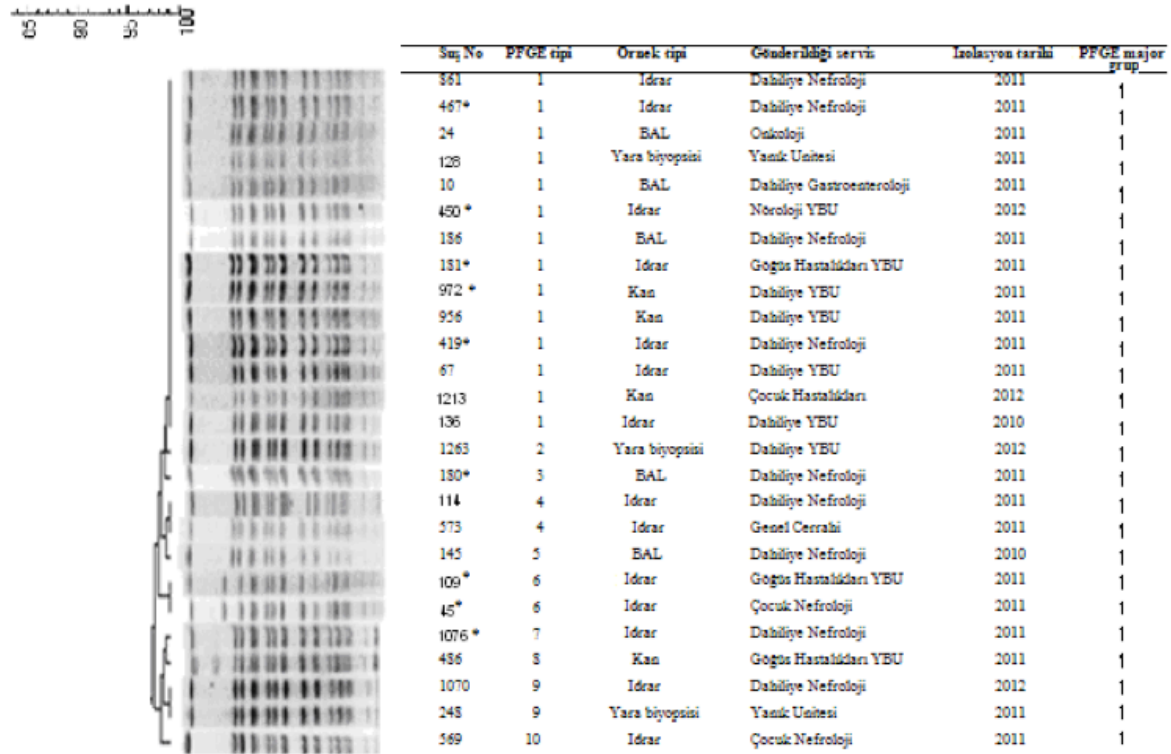
Smal enzimi ile kesilerek elde edilen DNA restriksiyon fragmanları %1'lik agaroz jelde CHEF DR II (Bio-Rad) sisteminde 6 V/cm akım, 14 °C'de ve 0,5 TBE içerisinde başlangıç ve bitiş zamanları 5,3 ve 34,9 sn olacak şekilde 20 sa yürütülerek gösterilmiştir. Suşlar arasındaki klonal ilişki, PFGE sonrasında jelde oluşan DNA bant paternlerinden Tenover ve ark. (21) tarafından tarif edilen kriterlere göre değerlendirilmiştir. BioNumerics Software Program (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak dendrogram oluşturulmuştur.

BULGULAR

Kasım 2010-Haziran 2012 tarihleri arasında hastane kaynaklı enfeksiyon gelişen ve yaşları 1-91 arasında değişen 20'si erkek ve 16'sı kadın olmak üzere toplam 36 hastadan enterokok izole edilmiştir. 36 suşun 18'i idrar, altısı kan, beşi bronkoalveolar lavaj (BAL), beşi yara, biri vajinal sürüntü, biri kataterden izole edilmiştir. Suşların dokuzu (%25) VRE olarak tanımlanmıştır. Tür dağılımı incelendiğinde; suşların 26'sının (%72) *E. faecium*, 10'unun (%28) ise *E. faecalis* olduğu saptanmıştır (Tablo 1). VRE suşlarının tamamı *E. faecium* içinde yer almıştır.

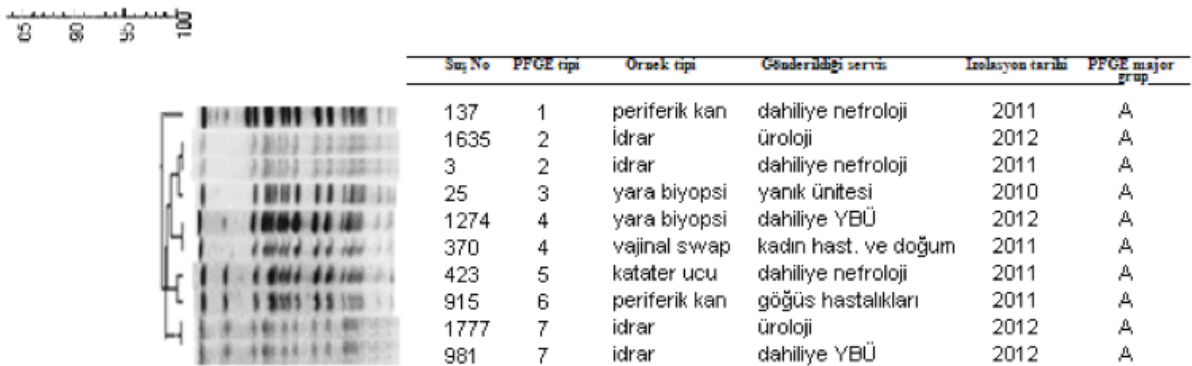
E. faecium izolatlarına ait PFGE paternlerinin dendrogramı yapılmıştır (Şekil 1). 26 izolatın DNA paternlerinin birebir karşılaştırılması sonucunda 10 PFGE tipi (pulsotip) saptanmıştır. Saptanan pulsotiplerden altı tanesinde birer suş bulunmaktadır. Küme sayısı dört olarak belirlenmiş ve her bir küme içindeki suş sayısı 2-14 arasında değişiklik göstermiştir. Toplam kümeleşme oranı 20/26 (%77) olarak saptanmış olup, bir major PFGE grubu bulunmuştur. Majör grup 1 içerisinde yer alan 26 suş %97 oranında benzerlik göstermiştir.

E. faecalis izolatlarına ait PFGE paternlerinin dendrogramı ise Şekil 2'de verilmiştir. On izolatın DNA paternlerinin karşılaştırılması sonucunda yedi pulsotip saptanmıştır. Bu pulsotiplerden dört tanesinde birer suş bulunmaktadır. Küme sayısı üç olarak belirlenmiş olup, her bir küme içindeki suş sayısı 2-3 arasında



Şekil 1. *E. faecium* suşlarına ait PFGE paternlerinin dendogramı. Örnek sayısı = 26

E. faecium suşlarına ait PFGE paternlerinin dendogramına baktığımızda 10 tane pulsotip ve toplam dört tane küme (1, 4, 6, 9 numaralı PFGE tipleri), altı tane özgü profil (2, 3, 5, 7, 8, 10 PFGE tipleri) görülmektedir. * : VRE suşları



Şekil 2. *E. faecalis* suşlarına ait PFGE paternlerinin dendogramı. Örnek sayısı = 10

E. faecalis suşlarına ait PFGE paternlerinin dendogramında; yedi pulsotip ve üç küme (2, 4, 7 numaralı PFGE tipleri) ile dört özgü profil (1, 3, 5, 6 numaralı PFGE tipleri) görülmektedir.

değişiklik göstermiştir. Toplam kümeleşme oranı 6/10 (%60) olup, bir majör PFGE grubu saptanmıştır. Major

grup A içerisinde yer alan 10 suş arasında %98 oranında benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 1. İzolatların klinik örnek tipine, gönderildiği servislere ve izolasyon tarihine göre dağılımları

Sıra No	Örnek No	Örnek Tipi	İzolat Adı	Gönderildiği Servis	İzolasyon Tarihi
1	861	İdrar	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Nefroloji	Ekim 2011
2	467	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Dahiliye Nefroloji	Temmuz 2011
3	24	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	<i>E. faecium</i>	Onkoloji	Ocak 2011
4	137	Periferik kan	<i>E. faecalis</i>	Dahiliye Nefroloji	Mart 2011
5	10	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Gastroenteroloji	Ocak 2011
6	1635	İdrar	<i>E. faecalis</i>	Üroloji	Mayıs 2012
7	186	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Nefroloji	Mart 2011
8	181	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Göğüs Hastalıkları YBÜ	Mart 2011
9	3	İdrar	<i>E. faecalis</i>	Dahiliye Nefroloji	Şubat 2011
10	956	Periferik kan	<i>E. faecium</i>	Dahiliye YBÜ	Kasım 2011
11	419	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Dahiliye Nefroloji	Mayıs 2011
12	67	İdrar	<i>E. faecium</i>	Dahiliye YBÜ	Ocak 2011
13	25	Yara biyopsi materyali	<i>E. faecalis</i>	Yanık Ünitesi	Kasım 2010
14	1274	Yara biyopsi materyali	<i>E. faecalis</i>	Dahiliye YBÜ	Şubat 2012
15	1263	Yara biyopsi materyali	<i>E. faecium</i>	Dahiliye YBÜ	Şubat 2012
16	180	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	<i>E. faecium</i> (VRE)	Dahiliye Nefroloji	Mart 2011
17	370	Vajinal swap	<i>E. faecalis</i>	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Haziran 2011
18	573	İdrar	<i>E. faecium</i>	Genel Cerrahi	Temmuz 2011
19	145	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Nefroloji	Aralık 2010
20	423	Kateter ucu	<i>E. faecalis</i>	Dahiliye Nefroloji	Haziran 2011
21	915	Periferik kan	<i>E. faecalis</i>	Göğüs Hastalıkları	Ekim 2011
22	1777	İdrar	<i>E. faecalis</i>	Üroloji	Haziran 2012
23	486	Periferik kan	<i>E. faecium</i>	Göğüs Hastalıkları YBÜ	Temmuz 2011
24	1070	İdrar	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Nefroloji	Mart 2012
25	248	Yara biyopsi materyali	<i>E. faecium</i>	Yanık Ünitesi	Nisan 2011
26	569	İdrar	<i>E. faecium</i>	Çocuk Nefroloji	Temmuz 2011
27	128	Yara biyopsi materyali	<i>E. faecium</i>	Yanık Ünitesi	Mart 2011
28	981	İdrar	<i>E. faecalis</i>	Dahiliye YBÜ	Şubat 2012
29	450	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Nöroloji YBÜ	Nisan 2012
30	972	Periferik kan	<i>E. faecium</i> (VRE)	Dahiliye YBÜ	Kasım 2011
31	1213	Periferik kan	<i>E. faecium</i>	Çocuk Hastalıkları	Ocak 2012
32	136	İdrar	<i>E. faecium</i>	Dahiliye YBÜ	Aralık 2010
33	114	İdrar	<i>E. faecium</i>	Dahiliye Nefroloji	Ocak 2011
34	109	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Göğüs Hastalıkları YBÜ	Şubat 2011
35	45	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Çocuk Nefroloji	Ocak 2011
36	1076	İdrar	<i>E. faecium</i> (VRE)	Dahiliye Nefroloji	Aralık 2011

YBÜ : Yoğun Bakım Ünitesi

TARTIŞMA

Günümüzde enterokokların hastane enfeksiyonlardaki önemi giderek artmaktadır. Hastane kaynaklı bakteriyemilerin ikinci en sık nedeni (%15) enterokok türleridir (25). Enterokoklar, hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarının beşinci sıklıkta (%8,5) nedenidir (26). Enterokoklar, başta glikopeptid grubu antibiyotikler olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı kökenler arasında kolayca aktarılabilen direnç göstermekte ve intestinal florada asemptomatik persistan kolonizasyon oluşturarak endojen kökenli enfeksiyonlara yol açabilmektedirler (27). Hastane kaynaklı enterokok enfeksiyonlarında antibiyotiklere karşı direnç giderek artmaktadır (28). Ayrıca, enterokoklar ile kolonizasyon ve enfeksiyon, başta yoğun bakım kliniklerinde yatan hastalar olmak üzere altta yatan hastalığı olan hastaları daha çok etkilemektedir (29, 30). Bu çalışma, dahiliye bölümündeki hastaların %44 (16/36)'ü de yoğun bakım, yanık ünitesi, onkoloji ve cerrahi servislerinde yatmakta olup, hastane kaynaklı enfeksiyon geliştiren hastalarda yapılmıştır.

İlk VRE suşları, 1988 yılında önce İngiltere sonra da Fransa'dan bildirilmiştir (10, 11). VRE enfeksiyonları, ABD'de ilk kez 1990 yılında görülmesine karşın, çok hızlı bir yayılım göstermiştir (31). Daha sonraki yıllarda dünyanın birçok bölgesinden VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu bildirimleri giderek artmıştır (12, 13). 2003 yılında sekiz Avrupa ülkesinden 13 mezkezi kapsayan bir çalışmaya göre, Avrupa'da VRE prevalansı %0-20 arasında değişmektedir (32). Ülkemizde 1998 yılında ilk VRE suşunun saptanmasının ardından günümüze değin farklı bölgelerden artan sayıda bildirimler yapılmıştır (14, 15, 33, 34). Çalışmamızda; enterokok suşlarının dörtte biri gibi önemli bir oranı VRE olarak saptanmıştır. Hastanemizdeki VRE oranının yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu yüksek direnç oranının hastanenin yetersiz enfeksiyon kontrol önlemlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Enterokok enfeksiyonlarında klinik örneklerden en sık (%80-90) elde edilen izolat *E. faecalis*'tir. İkinci sıklıkta (%5-10) karşımıza çıkan izolat *E. faecium*'dur. Hastane kaynaklı enfeksiyonlarda ise en sık karşılaşılan tür *E. faecium*'dur (9). Gerek hastane enfeksiyonları gerekse kolonizasyonla ilişkili olarak izole edilen VRE türleri arasında *E. faecium* oranının giderek arttığı dikkat çekmektedir. Özellikle bakteriyemiye yol açan *E. faecium* izolatları arasında VRE oranının (%19), *E. faecalis* izolatları arasındaki VRE oranına (%4) göre daha yüksek olduğu 2005 yılında yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (35). Kuzucu ve ark. (36), tarafından yapılan bir çalışmada da, fekal kolonizasyonda *E. faecium*'un (%71) hakim olduğu gösterilmiştir. Çalışmaya aldığımız 36 suşun 26'sının *E. faecium* (%72) olduğu, bunların ise dokuzunun VRE (%35) olduğu saptanmıştır.

Hastane kaynaklı VRE salgılarının önlenmesi, kontrolü ve epidemiyolojik analizlerinin yapılması önemli bir halk sağlığı çalışmasıdır. Bir monoklonal salgın kontrol altına alınmazsa endemite gelişebilecektir (30). Hastane kaynaklı VRE suşlarının moleküler tiplendirmesinde MLST, multi lokus variable number tandem repeat (MLVA) ve PFGE yöntemlerinin karşılaştırıldığı; 2006 yılında yapılan bir çalışmada, PFGE paternlerinin daha yüksek rezolüsyon gösterdiği tespit edilmiştir (37). 2008 yılında yapılan bir diğer çalışmada, VRE suşlarının moleküler tiplendirmesinde MLVA ve PFGE yöntemleri karşılaştırılmış, PFGE'nin ayırım gücünün daha fazla olduğu tespit edilmiştir (38). Fransa'dan 2011 yılında yapılan bir çalışmada, 2001-2008 yılları arasında 195 hastanenin VRE salgılarının değerlendirilmiş; PFGE analizi ile 161 farklı patern saptanmış ve genel olarak hastanelerde predominant bir klonun hakim olduğu bildirilmiştir (39). 2012 yılında yapılan bir çalışmada; yeni doğan yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilen 20 hastane kaynaklı enterokok suşu değerlendirilmiş ve PFGE yöntemiyle izolatlar arasındaki çapraz bulaş gösterilmiştir (40). Çalışmamızda, PFGE yöntemiyle elde ettiğimiz

bulgular, *Enterococcus* spp. izolatlarının klonal yönden ilişkili olduğunu ve dolayısıyla çapraz kontaminasyonun varlığını göstermektedir.

Sonuç olarak, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Kasım 2010 - Haziran 2012 tarihleri arasında yatan ve hastane kaynaklı enfeksiyon tanısı alan hastalardan izole edilen enterokok suşları arasında çapraz bulaş oranının yüksek olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın sonucunda enterokokların izlenmesinde genotiplendirme çalışmaları yapılmasının, PFGE

ile hastanede bulunan enterokok suşlarının rutin olarak ve kısa periyotlarda değerlendirilmesinin, hastanelerde enfeksiyon kontrol programının iyileştirilmesi için sağlık çalışanlarının el hijyeninin sağlanması, medikal cihazlar ve kontamine yüzeylerin etkili bir şekilde dezenfeksiyonu ve sağlık personelinin eğitimi gibi enfeksiyon kontrol önlemlerinin yeterli ve etkili şekilde alınmasının önemini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Moellering RC. *Enterococcus species*, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc species*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. New York. Churchill Livingstone, 2005: 2411-21.
2. Eliopoulos GM. Vancomycin-resistant enterococci. Mechanism and clinical relevance. Infect Dis Clin North Am, 1997; 11 (4): 851-65.
3. Papanicolaou GA, Meyers BR, Meyers J, Mendelson MH, Lou W, Emre S, et al. Nosocomial infections with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* liver transplant recipients: risk factors for acquisition and mortality. Clin Infect Dis, 1996; 23 (4): 760-6.
4. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbiol etiology of nosocomial infections. Am J Med, 1991; 91(Suppl B): 72-5.
5. Yüce A, Karaman M, Gülay Z, Yulug N. Yeni doğanlarda vankomisin dirençli enterokokların fekal taşıyıcılığı. ANKEM, 1999; 13: 7-11.
6. Linden PK, Pasculle AW, Manez R, Kramer DJ, Fung JJ, Pinna AD, et al. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin-susceptible *E. faecium*. Clin Infect Dis, 1996; 22 (4): 663-70.
7. Woodford N, Johnson AP, Morrison D, Speller DC. Current perspectives on glycopeptide resistance. Clin Microbiol Rev, 1995; 8 (4): 585-615.
8. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. N Eng J Med, 2000; 342: 710-21.
9. English BK, Shenep JL. Enterococcal and viridans streptococcal infections. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 5th edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 2004: 1175-92.
10. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet, 1988; 1 (8575-6): 57-8.
11. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med, 1988; 319 (3): 157-61.
12. Woodford N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. Microb Drug Resist, 2001; 7: 229-34.
13. Anonymous. Centers for Disease Control and Prevention. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin in the United States, 1989-1993. MMWR 1993;42:597-9.

14. Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D, Gültekin M, Çolak D, Yeşilipek A, ve ark. Vankomisine dirençli *Enterococcus casseliflavus* suşu. ANKEM, 1998; 12 (2): 113.
15. Basustaoglu A, Aydoğan H, Beyan C, Yalcin A, Unal S First glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolate from blood culture in Ankara, Turkey. Emerg Infect Dis, 2001; 7: 160-1.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
17. Top J, Schouls LM, Bonten MJM, Willems RJ. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. J Clin Microbiol, 2004; 42 (10): 4503-11.
18. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol, 2002; 40: 1963-71.
19. Kühn I, Burman LG, Haeggman S, Tullus K, Murray BE. Biochemical fingerprinting compared with ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis of DNA for epidemiological typing of enterococci. J Clin Microbiol, 1995; 33: 2812-7.
20. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol, 1995; 33: 24-7.
21. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol, 1995; 33 (9): 2233-9.
22. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev, 2000; 13: 686-707.
23. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. Am J Infect Control, 1988; 16(3): 128-40.
24. Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, et al. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 2001; 39 (10): 3481-5.
25. Esel D, Doganay M, Alp E, Sumerkan B. Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish university hospital: epidemiology, microbiology and patient outcome. Clin Microbiol Infect, 2003; 9(10): 1038-44.
26. Leblebicioglu H, Esen S. Turkish nosocomial urinary tract infection study group. hospital-acquired urinary tract infections in Turkey: a nationwide multicenter point prevalence study. J Hosp Infect, 2003; 53 (3): 207-10.
27. Arslan U, Demir E, Oryaşın E, Türk Dağı H, Tuncer I, Fındık D, et al. MLST types of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from blood cultures. Mikrobiyol Bul, 2013; 47 (3): 432-41.
28. Akan O, Kanra G, Ecevit Z, Ceyhan M, Seçmeer G, Berkman E. Antibiotic susceptibilities of enterococci isolated from Turkish children. Turk J Pediatr, 1997; 39 (1): 13-7.
29. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, Healthcare infection control practices advisory committee. management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. Am J Infect Control, 2007; 35 (Suppl 2): S165-93.
30. Hayden MK. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis, 2000; 31: 1058-65.
31. Mato R, de Lencastre H, Roberts RB, Tomasz A. Multiplicity of genetic back grounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City Hospital. Microbiol Drug Res, 1996; 2: 309-17.
32. Goossens H, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and *in vitro* susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. J Antimicrob Chemother, 2003; 51 Suppl 3: iii5-12.
33. Çolak D, Naas T, Gunseren F, Fortineau N, Ogunc D, Gultekin M, et al. First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. J Antimicrob Chemother, 2002; 50: 397-401.
34. Comert FB, Kulah C, Aktas E, Ozlu N, Celebi G. 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; 26: 57-61.

35. Rudy M, Zientara M, Bek T, Martirosian G. Occurrence of antibiotic resistant enterococci in clinical specimens from a pediatric hospital. *Pol J Microbiol*, 2005; 54 (1): 77-80.
36. Kuzucu C, Cizmeci Z, Durmaz R, Durmaz B, Ozerol IH. The prevalence of fecal colonization of enterococci, the resistance of the isolates to ampicillin, vancomycin, and high-level aminoglycosides, and the clonal relationship among isolates. *Microb Drug Resist*, 2005; 11 (2): 159-64.
37. Abele-Horn M, Vogel U, Klare I, Konstabel C, Trabold R, Kurihara R, et al. Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, 2006; 44 (11): 4009-13.
38. Top J, Banga NM, Hayes R, Willems RJ, Bonten MJ, Hayden MK. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in a setting of polyclonal endemicity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect*, 2008; 14 (4): 363-9.
39. Bourdon N, Fines-Guyon M, Thiolet JM, Maugat S, Coignard B, Leclercq R, et al. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother*, 2011; 66 (4): 713-21.
40. Böhme H, Königsmark C, Klare I, Zischka M, Werner G. Cross-transmission rates of enterococcal isolates among newborns in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Rep*, 2012; 4(1): e15.