

# VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOKLARIN MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ANALİZİ

Faruk Karakeçili<sup>1</sup>, Burcu Dalyan Cilo<sup>2</sup>, Aytekin Çıkman<sup>3</sup>, Halis Akalın<sup>4</sup>, Cüneyt Özakin<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan.

<sup>2</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Bursa.

<sup>3</sup>Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan.

<sup>4</sup>Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa

<sup>5</sup>Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

## ÖZET

**Giriş:** Vankomisine dirençli enterokok (VRE) enfeksiyonlarının kontrolünde, etkenin erken tespiti ve nozokomiyal salgınla ilişkilerinin gösterilmesi önemlidir. Bu çalışmada, hastanemizde izole edilen VRE suşlarının klonal ilişkileri belirlenerek epidemiyolojisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Ocak 2001-Aralık 2009 yılları arasında izole edilen tüm VRE'lerin yıllara göre dağılımı incelenerek epidemi dönemleri saptandı. Tür tanımlaması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde otomatize bakteri tanımlama sistemi kullanıldı. Vankomisin direnci E-test yöntemiyle konfirme edildi. Klonal ilişkinin tespitinde Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) kullanıldı.

**Bulgular:** Dokuz yıllık periyotta 664 VRE suşu izole edildi. *E. faecium*'un en sık saptanan tür olduğu saptandı. Epidemi dönemlerinde izole edilen 83 *E. faecium* suşunun 11 klonal kümede toplandığı belirlendi. En büyük küme olan F-2'de yalnızca 2009 yılına ait 26 izolata olduğu tespit edildi. 2001 ile 2002 yılı epidemilerinde izole edilen suşlar

arasında anlamlı benzerlik olduğu gözlemlendi. F-4'te bulunan beş izolat ilk olarak 2001'de tespit edildi, daha sonra 2003'te saptandı. Diğer üç epidemi dönemindeki suşların kendi içinde benzediği, ancak farklı epidemiler arasında anlamlı bir suş benzerliği olmadığı görüldü.

**Tartışma ve Sonuç:** Tüm dünyada VRE türleri arasındaki oranı giderek artan *E. faecium* hastanemizde en sık saptanan türdür. Çalışmamızda 2001 ile 2002 epidemilerinde izole edilen birçok suş arasında anlamlı benzerlik olması, bu klonun varlığını uzun süre koruduğunu ve bu iki epidemi döneminde hastanede baskın hale geldiğini göstermiştir. 2009 yılındaki epidemi döneminde tüm suşlar daha önce hastanemizde izole edilmeyen F-2 klonunda toplanmış ve epidemiden sorumlu klon olduğu gösterilmiştir. Hastane epidemilerine neden olan VRE'lerin yayılımının önlenmesinde önleyici tedbirler alınması ve eğitim çalışmaları yapılması önem taşımaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *Enterococcus faecium*, moleküler epidemiyolojik analiz, pulse field jel elektroforezi, vankomisine dirençli enterokok. **Nobel Med 2017; 13(3): 22-28**

## ABSTRACT

**Introduction:** In the control of vancomycin-resistant enterococci (VRE), it is important to identify these bacteria rapidly and demonstrate their relationship with nosocomial outbreaks. In this study we aimed to investigate epidemiology of VRE strains by determination of clonal relationships of these bacteria.

**Material and Method:** The VRE strains isolated from January 2001 to December 2009 were examined in terms of their distribution by year and by their clustering patterns into epidemic groups. Identification and antibiotic susceptibilities were tested by using the otomated system. Vancomycin resistance was confirmed by the E-test method. PFGE was used to determine the clonal relationship between the strains.

**Results:** 664 VRE strains were isolated in periods of nine years. *E. faecium* was found to be the most prevalent species. Eigthy-three *E. faecium* strains isolated during the epidemic periods were characterized by PFGE types from 11 different clonal clusters. The largest of these clusters, F-2, contained 26 isolates which was isolated in

2009. There was a significant similarity between strains isolated in 2001 and 2002 epidemics. The F-4 clone containing five isolates was first identified in 2001, and then detected in 2003. The strains isolated in the other three epidemic periods displayed certain insignificant similarities.

**Discussion:** *E. faecium* which has been increasing among the VRE species all over the world, was found to be the most common isolate. In this study, a significant similarity was observed between strains isolated in the epidemics of 2001 and 2002, which indicates that this clone survived for a long time and became prevalent in the hospital during this period. All the strains in the 2009 epidemic period were clustered in one clone, F-2. Since this clone had not previously been isolated in our hospital, it is considered that it spreaded in the hospital and was the only clone responsible for the epidemic of 2009. To prevent VRE spread that may result hospital epidemics, it is important to well informe and educate our staff concerning these infections and preventive measures.

**Keywords:** *Enterococcus faecium*, molecular epidemiological analysis, pulsed field gel electrophoresis, vancomycin resistant enterococci. Nobel Med 2017; 13(3): 22-28

## GİRİŞ

Çeşitli antibiyotiklere intrinsek dirençli olmaları ve yeni direnç geliştirebilme yetenekleri enterokokların son yıllarda nozokomiyal enfeksiyonlarda önemli etyolojik ajanlar arasında yer almasına neden olmuştur.<sup>1</sup> Önceleri normal bağırsak florasının elemanı ve düşük virulanslı patojenler arasında yer alan enterokoklar, yıllar içinde nozokomiyal bakteriyemi, cerrahi yara enfeksiyonları ve üriner sistem enfeksiyonları başta olmak üzere klinisyenlerin karşısına daha sık çıkan etkenlerden biri haline getirmiştir.<sup>2-4</sup> Yoğun ve hatalı antibiyotik kullanımı, başta aminoglikozid grubu olmak üzere glikopeptit türevi antibiyotikler dahil birçok antibiyotiğe karşı enterokokların direnç geliştirmesine neden olmuştur.<sup>5,6</sup>

Enterokokların etken olduğu enfeksiyonların genellikle hastanın kendi florasından kaynaklanan endojen enfeksiyonlar şeklinde oluştuğu düşünülmekteyken, yapılan çalışmalar ekzojen yolla da enfeksiyona neden olabileceklerini göstermiştir. Özellikle antibiyotiklere dirençli türler, hastadan hastaya veya enfekte hastane personeli tarafından hastalara bulaştırılabilmektedir. Böylece hastane

içinde veya hastaneler arasında yayılarak salgınlara sebep olabilmektedir.<sup>7,8</sup>

Hastanede yatan hastalarda VRE kolonizasyonunun erken tespiti, VRE yayılmasının önlenmesinde ve bu suşların salgın suşları ile ilişkisinin gösterilmesinde önemlidir.<sup>9</sup> Salgınlara yol açan birçok mikroorganizma için izolatlar arası ilişkinin tespiti ve kaynağının gösterilmesinde, ayırım gücü en yüksek olan yöntem PFGE (kesik alan jel elektroforezi)'dir.<sup>10,11</sup>

Bu çalışmada; hastanemizdeki VRE epidemileri sırasında, yoğun bakım üniteleri ile çeşitli kliniklerde yatan hastalardan izole edilen VRE izolatlarının sebep olduğu hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisi açısından PFGE yöntemi kullanılarak klonal ilişkilerinin tespiti amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Bakteriyel İzolatlar

Ocak 2001-Aralık 2009 yılları arasında izole edilen tüm VRE suşlarının yıllara göre dağılımı incelendi. Bu epidemi dönemlerinde, hastanemizdeki 4 yoğun bakım ünitesi ve 6 farklı klinikte yatan hasta örneklerinden izole edilen 83 *E. faecium* suşu 5 grup altında değerlendirildi (Tablo).

| Tablo. 83 VRE suşunun izole edildiği klinik ve materyale göre dağılımı. |                         |                |     |                     |                |     |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------|-----|---------------------|----------------|-----|
| Grup                                                                    | Klinik                  | Suş sayısı (n) | (%) | Materyal            | Suş sayısı (n) | (%) |
| Grup 1                                                                  | Enfeksiyon Hastalıkları | 8              | 30  | Perianal            | 20             | 77  |
|                                                                         | Hematoloji              | 5              | 19  | Kan                 | 3              | 11  |
|                                                                         | Göğüs Hastalıkları      | 4              | 15  | Kateter             | 1              | 4   |
|                                                                         | Göğüs Yoğun Bakım       | 3              | 12  | Yara-pü             | 1              | 4   |
|                                                                         | Onkoloji                | 3              | 12  | İdrar               | 1              | 4   |
|                                                                         | Reanimasyon             | 3              | 12  |                     |                |     |
|                                                                         | <b>Toplam</b>           | 26             | 100 | <b>Toplam</b>       | 26             | 100 |
| Grup 2                                                                  | Çocuk Hastalıkları      | 13             | 100 | Perianal            | 12             | 92  |
|                                                                         |                         |                |     | Periton sıvısı      | 1              | 8   |
|                                                                         | <b>Toplam</b>           | 13             | 100 | <b>Toplam</b>       | 13             | 100 |
| Grup 3                                                                  | Çocuk Yoğun Bakım       | 8              | 57  | Perianal            | 11             | 79  |
|                                                                         | Hematoloji              | 4              | 29  | İdrar               | 1              | 7   |
|                                                                         | Çocuk Hastalıkları      | 2              | 14  | Yara-pü             | 1              | 7   |
|                                                                         |                         |                |     | Boğaz               | 1              | 7   |
|                                                                         | <b>Toplam</b>           | 14             | 100 | <b>Toplam</b>       | 14             | 100 |
| Grup 4                                                                  | Hematoloji              | 15             | 88  | Perianal            | 10             | 59  |
|                                                                         | Çocuk Hastalıkları      | 2              | 12  | Kan                 | 4              | 23  |
|                                                                         |                         |                |     | İdrar               | 2              | 12  |
|                                                                         |                         |                |     | Kateter             | 1              | 6   |
|                                                                         | <b>Toplam</b>           | 17             | 100 | <b>Toplam</b>       | 17             | 100 |
| Grup 5                                                                  | Reanimasyon             | 5              | 39  | Perianal            | 10             | 76  |
|                                                                         | Nöroloji Yoğun Bakım    | 3              | 23  | Kan                 | 1              | 8   |
|                                                                         | Yanık Ünitesi           | 3              | 23  | İdrar               | 1              | 8   |
|                                                                         | Çocuk Yoğun Bakım       | 2              | 15  | Yara-pü             | 1              | 8   |
|                                                                         | <b>Toplam</b>           | 13             | 100 | <b>Toplam</b>       | 13             | 100 |
| Tüm Gruplar                                                             | Hematoloji              | 24             | 29  | Perianal            | 63             | 76  |
|                                                                         | Çocuk Hastalıkları      | 17             | 20  | Kan                 | 8              | 9   |
|                                                                         | Çocuk Yoğun Bakım       | 10             | 12  | İdrar               | 5              | 6   |
|                                                                         | Enfeksiyon Hastalıkları | 8              | 9   | Yara-pü             | 3              | 4   |
|                                                                         | Reanimasyon             | 8              | 9   | Kateter             | 2              | 3   |
|                                                                         | Göğüs Hastalıkları      | 4              | 5   | Periton sıvısı      | 1              | 1   |
|                                                                         | Göğüs Yoğun Bakım       | 3              | 4   | Boğaz               | 1              | 1   |
|                                                                         | Onkoloji                | 3              | 4   |                     |                |     |
|                                                                         | Nöroloji Yoğun Bakım    | 3              | 4   |                     |                |     |
|                                                                         | Yanık Ünitesi           | 3              | 4   |                     |                |     |
|                                                                         | <b>Genel Toplam</b>     | 83             | 100 | <b>Genel Toplam</b> | 83             | 100 |

**Grup 1:** 2009 yılının Ekim, Kasım ve Aralık aylarında Enfeksiyon Hastalıkları, Hematoloji, Göğüs Hastalıkları ve Onkoloji Klinikleri ile Göğüs Hastalıkları ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitelerinde yatan hastalarda izole edilen 26 suş bu grupta değerlendirildi.

**Grup 2:** 2007 yılının Ağustos, Eylül ve Ekim aylarında Çocuk Hastalıkları Kliniği'nde yatan hastalarda izole edilen 13 suş bu grupta değerlendirildi.

**Grup 3:** 2003 yılının Ocak, Şubat ve Mart aylarında Hematoloji ve Çocuk Hastalıkları Klinikleri ile Çocuk Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatan hastalarda izole edilen 14 suş bu grupta değerlendirildi.

**Grup 4:** 2002 yılının Ocak, Şubat ve Mart aylarında Çocuk Hastalıkları ve Hematoloji Kliniği'nde yatan hastalarda izole edilen 17 suş bu grupta değerlendirildi.

**Grup 5:** 2001 yılının Mart, Nisan ve Mayıs aylarında, Yanık Ünitesi, Nöroloji Kliniği, Çocuk Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatan hastalarda izole edilen 13 suş bu grupta değerlendirildi.

### Bakteriyolojik Çalışma

Rutin taramalarda alınan perianal sürüntü örnekleri; 6 µg/ml vankomisin içeren Enterococcosel broth (BD, BBL, Fransa) besiyerlerine ekildi. Yetmişiki saat, 45°C'de inkübasyon süresince besiyerinde siyah renk oluşumu gözlenen örneklerden %5 Koyun Kanlı Colombia agar besiyerine (BD, BBL, Almanya) pasaj yapıldı. İkinci ekim hattına vankomisin diski konarak 37°C'de bir gecelik inkübasyon sonucunda üreyen koloniler incelendi. Vankomisin diski etrafında, diske en yakın bölgede üreyen ve enterokoka benzeyen tek koloni alınıp %5 Koyun Kanlı Colombia Agara (BD, BBL, Almanya) tekrar pasajlandı. Yine ekim hattına vankomisin diski konarak 37°C'de bir gece daha inkübe edildi. Vankomisin diskinde direnci gösteren zon içinde saf halde üreyen enterokok kolonileri Crystal (BD, BBL CRYSTALTM, İrlanda) sistemi ile tür düzeyinde identifiye edildi.

Rutin tarama kültürleri dışında laboratuvara gönderilen klinik materyallerin (kan, idrar, yara/pü, santral kateter, periton sıvısı ve boğaz) uygun besiyerine ekimi yapıldı. Saf kültürlerin identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri için Phoenix (BD, Sparks MD, USA) sistemi kullanıldı. Tür düzeyinde tanımlanan tüm VRE izolatlarının vankomisin direnci E-test yöntemi ile doğrulandı.

### Moleküler Çalışma

Bu çalışmada suşlar arası klonal ilişkinin tespitinde PFGE yöntemi kullanıldı. PFGE ile yapılan incelemede, Garcia-Migura ve ark. yöntemine uygun olarak hazırlanan kalıplar, Turabelidze ve ark.'nın önerdiği elektroforez şartlarında, CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, USA) cihazında yapıldı.<sup>12,13</sup>

### İzolatların Hazırlanması

Saf kültür halinde üreyen koloniler 2 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içinde süspanse edildi. Bu süspansiyondan 120 µl 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 10 mg/ml lizozom içeren stok

solüsyondan 30 µl eklendi. Bu tüpler 37°C'de benmaride (Siemens-Healthcare BS 402) 10 dakika inkübe edildi.

### İzolatların Agaroz Gömülmesi

HST içerisinde %2'lik düşük erime sıcaklıklı agaroz (BIO-RAD, certified, Low Melt Agarose 161-3111) hazırlandı. İnkübasyondan sonra bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 100 µl düşük erime sıcaklıklı agaroz bulunan tüpe eklendi.

### Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması

5 ml'lik sterilkapaklı tüplere, 1 ml Hücre Lizis Solüsyonu-1 (HLS-1) [10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, %0,2 sodyum deoksikolat, %0,5 sarkozil] konuldu. İçinde bakteri bulunan agaroz kalıptan çıkarılıp lizis solüsyonuna yerleştirildi. Kalıplar 37°C'de 2 saat su banyosunda bekletildi. HLS-1 dökülerek, yerine 1 ml Hücre Lizis Solüsyonu-2 (HLS-2) [ES: 250 mM EDTA (pH 9,0), %1 sarkozil, 50 mikrogram/ml proteinaz K] konuldu. 50°C'de 1 saat su banyosunda bekletildi. Daha sonra agaroz kalıpları, 50°C'de 30'ar dakika süre ile toplam dört kez yıkandı. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu. Agaroz, CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, USA) elektroforeze tabii tutuldu.

### Görüntüleme ve Bant Profillerinin Analizi

Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml 0,5xTBE tamponu içine alınıp 20 dakika boyandı. Oluşan bant profillerinin analizi, Bionumerics (Applied Maths, Inc., Belgium) version 6.01 yazılımı ile %1,5 bant toleransı, %1 optimizasyon ayarı kullanılarak yapıldı. Resimler arası normalizasyon yapıldı ve bant profillerinin dendrogramı oluşturuldu. PFGE dendrogramlarında %85 ve üzeri benzerlik katsayısına sahip izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi.

### BULGULAR

Çalışmada 9 yıl boyunca 10 farklı klinik ve yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan 664 VRE suşu izole edildi. Bu izolatlardan 651 suşun (%98) vankomisine dirençli (VR) *E. faecium* olduğu tespit edildi. Bu suşlardan epidemi dönemlerinde izole edilen 83 tanesi çalışmaya dahil edildi. Tüm izolatların E-test yöntemi ile vankomisin MİK değeri 256 µg/ml'nin üzerinde bulundu.

Grup 1 içinde, 7 ayrı klinikte yatan hastalardan alınan farklı klinik örneklerden izole edilen 26 *E. faecium* suşu değerlendirildi. Bu izolatların tümünün F-2 olarak adlandırılan tek bir klonal kümede toplandığı belirlendi. F-2 kümesinde yer alan bu 26 izolatın 13 tanesi %100 uyumlu iken diğer 13 izolatın da kendi içinde %100 uyumlu olduğu, tüm izolatların ise en az %92 benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Grup 2 içinde, Çocuk Kliniği'nde yatan hastalarda izole edilen VRE suşlarından seçilen 13 *E. faecium* suşu değerlendirildi. Bu izolatların 4'ü F-6, 3'ü F-11 olarak adlandırılan klonal kümede toplanırken bu kümelerin dışında kalan 6 farklı izolat olduğu tespit edildi.

Grup 3 içinde, Hematoloji ve Çocuk Klinikleri ile Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatan hastalarda izole edilen 14 *E. faecium* suşu değerlendirildi. Bu grupta en büyüğü 9 izolat içeren F-5 klon kümesi oluştu. F-5'te Çocuk Kliniği ve Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi'nde izole edilen VRE suşları toplanırken Hematoloji Kliniği'nde yatan hastalarda izole edilen VRE'lerden farklı oldukları tespit edildi.

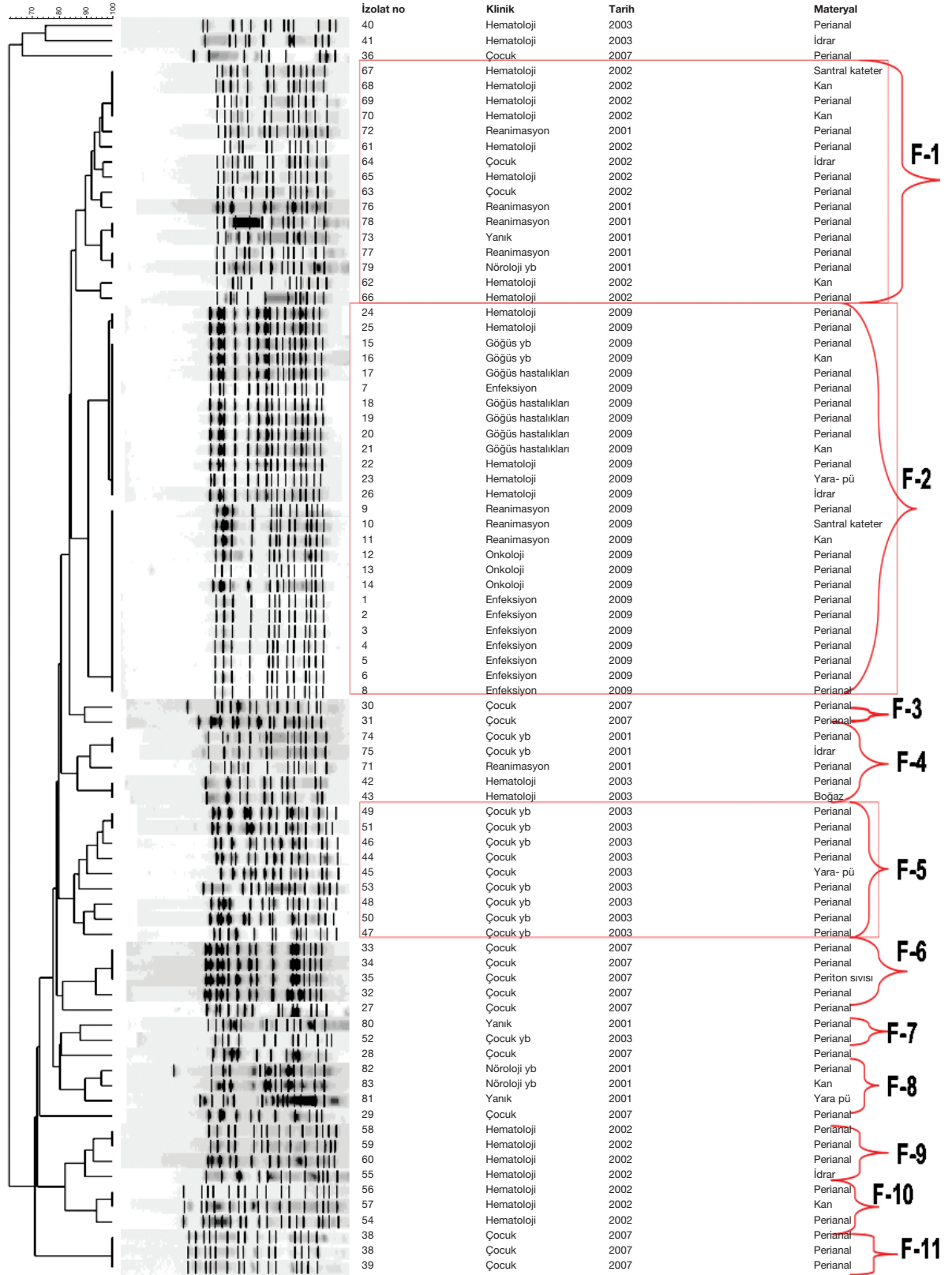
Grup 4 içinde, Çocuk ve Hematoloji Klinikleri'nde izole edilen 17 *E. faecium* suşu değerlendirildi. Bu grupta 4 izolatın bulunduğu F-9 ve 3 izolatın bulunduğu F-10 klon kümelerinin oluştuğu tespit edildi. Diğer 10 izolatın ise ilk olarak 2001 yılında görülen ve toplamda 16 izolatın bulunduğu F-1 klonal kümede toplandığı tespit edildi.

Grup 5 içinde, Reanimasyon, Çocuk ve Nöroloji Yoğun Bakımları ile Yanık Ünitesi'nde izole edilen 13 *E. faecium* suşu değerlendirildi. Bu grupta 3 izolatın bulunduğu F-8 klon kümesi oluşurken, 6 izolatın ise 2002 yılı suşlarını da içeren F-1 klonal kümede toplandığı belirlendi. Tüm gruplarda çalışmaya dahil edilen izolatların tespit edildiği klinikler, materyalin türü, sayısı ve oranları Tablo'da gösterilmiştir.

Tüm gruplarda, çalışmaya dahil edilen 83 *E. faecium* suşunun bir arada değerlendirilmesi sonucu; suşların 11 farklı klonal küme içinde toplandığı belirlendi. Bu klonal kümeler; 26 izolatın olduğu F-2, 16 izolatın bulunduğu F-1, 9 izolatın bulunduğu F-5, 5 izolatın bulunduğu F-4, 4'er izolatın bulunduğu F-6 ile F-9, 3'er izolatın bulunduğu F-8, F-10 ile F-11, 2'er izolatın bulunduğu F-3 ile F-7 iken, bu klonal kümelerin dışında kalan 6 izolat olduğu tespit edildi (Şekil).

Bu kümelerden en büyüğü olan F-2 klonal kümede; tümü grup-1 içinde değerlendirilen 2009 yılına ait 26 izolatın olduğu, diğer yıllara ait izolatların yer almadığı görüldü. Bu 26 izolatın 8'i Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nde, diğer 16 izolat ise Hematoloji (5), Göğüs Hastalıkları (4), Onkoloji (3) Klinikleri ile Reanimasyon (3) ve Göğüs Hastalıkları (3) Yoğun Bakım Üniteleri'nde saptandı (Şekil).

Diğer bir klonal küme olan F-1'de ise; grup-4 içinde değerlendirilen 2002 yılına ait 10 izolat ile grup-5 içinde değerlendirilen 2001 yılına ait 6 izolatın toplandığı tespit edildi. Bu 16 izolatın 8'i Hematoloji Kliniği'nde saptanırken diğer 8 izolat ise Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi (4) ile Çocuk (2), Yanık (1) ve Nöroloji (1) Kliniklerinde saptandı.



Şekil. Toplam 83 VRE suşunun PFGE ile elde edilen dendrogramı.

F-4 klonal kümesinde 5 izolat bulunurken, ilk olarak 2001 yılında Çocuk ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitelerinde izole edilen bu klonun daha sonra 2003 yılında Hematoloji Kliniği'nde yatan 2 hastanın farklı klinik örneklerde üreyen suşlar ile aynı olduğu

saptandı. 2007 yılındaki epidemik dönemde ise Çocuk Hastalıkları Kliniği'nde yatan hastalarda izole edilen suşların dendrogram analizinde, kendi içinde en az %85 benzerlik gösterdiği, ancak diğer epidemik dönemlerinde tespit edilen suşlarla anlamlı bir benzerlik



göstermediği (%85'ten düşük benzerlik katsayısı) belirlendi. Çalışmaya dahil edilen tüm izolatların tespit edildiği klinik, materyal ve tarihleri ile suşlar arasındaki klonal ilişki Şekil'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan gastrointestinal sistem florasının üyesi olan enterokoklar, hastanede yatan riskli hasta grupları için önemli bir nozokomiyal enfeksiyon etkenleridir.<sup>14,15</sup> Tüm dünyada hem hastane enfeksiyonlarında hem de kolonizasyonla ilişkili olarak izole edilen VRE türleri arasında *E. faecium* oranının giderek arttığı ve yüksek düzey glikopeptit direncinin yayılmasından sorumlu olduğu tespit edilmiştir.<sup>16-18</sup> Benzer şekilde VR *E. faecium*'un hastanemizde VRE izolatları arasında en sık izole edilen tür olduğu belirlenmiştir.

Bakterilerin epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi için izolatların tür düzeyinde tanımlanması ve direnç özelliklerinin belirlenmesinin yanı sıra, moleküler epidemiyolojik yöntemlerle izolatlar arasındaki klonal ilişkinin gösterilmesi gereklidir.<sup>19</sup> Cheng ve ark tarafından yapılan bir çalışmada, üçüncü basamak bir hastanenin Beyin Cerrahi Klinik ve Yoğun Bakım Ünitesi'nde, bir aylık periyotta görülen VR *E. faecium* salgını araştırılmıştır.<sup>20</sup> İlk VRE suşu izole edildikten sonraki bir ay süresince temas takipleri yapılmış, indeks olgu ile birlikte 4 hasta örneğinde ve 2 tane de çevre kültüründe VR *E. faecium* suşu izole edilmiştir. PFGE yöntemi ile bu 6 suşun aynı bant profiline sahip olduğu tespit edilmiş ve bu suşlar dışında örneklerden VRE izole edilmemiştir. Araştırmacılar PFGE ile klonal ilişkilendirmenin salgın sürveyansı için önemini vurgulamışlardır. Başka bir çalışmada ise Brilliantova ve ark hematolojik malignitesi olan hastalardan izole edilen 129 VR *E. faecium* suşunun klonal ilişkisini değerlendirmiş ve suşların 23 farklı gen kümesi (A-W) içerisinde yer aldığını göstermişlerdir.<sup>21</sup> Çalışmada en geniş klonal kümelerin, 30 üyeli A (A1-A30) ile 8 üyeli F(F1-F8) kümeleri olduğu bildirilmiş ve PFGE yönteminin VRE sürveyansındaki önemi vurgulanmıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Coşkun ve ark. bir yıllık dönemde 38 VRE suşu arasındaki klonal ilişkiyi araştırmıştır.<sup>22</sup> Araştırmacılar, çalışmalarında altı farklı klon (A-F) elde ederken A, B, C, D, E ve F klon kümelerinde sırasıyla 8, 10, 3, 5, 3 ve 3 izolat saptayarak, etkili sürveyans çalışmalarının gerekliliğini ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda ise 83 *E. faecium* suşu 11 farklı klonal küme (F1-F11) içinde toplanmıştır. Bu klon kümelerinde sırasıyla; 16, 26, 2, 5, 9, 4, 2, 3, 4, 3 ve 3 izolat toplanırken bu klonal kümelerin dışında kalan 6 izolat olduğu tespit edilmiştir.

PFGE yöntemi ile bu klonal kümelerden en büyüğü olan F-2'de; tümü grup-1 içinde değerlendirilen 2009 yılına ait 26 izolatın olduğu, diğer yıllara ait izolatların yer almadığı tespit edilmiştir. 2009 yılındaki epidemi döneminde izole edilen bu F-2 klonunun, hastanemizin farklı Klinik ve Yoğun Bakım Ünitelerinde hakim tek klon olduğu belirlenmiştir. D'azevedo ve ark. yaptıkları çalışmadakine benzer şekilde, bizim çalışmamızda 2009 yılındaki epidemide tespit edilen F-2 klonunun önceki yıllarda izole edilen klonal suşlardan farklı olduğu belirlenmiştir.<sup>17</sup> Hastanemizin genelinde bu tek klonun disseminasyonu sonucu daha önceki suşların yerini aldığı ve baskın hale geldiği tespit edilmiştir.

2002 yılındaki epidemi döneminden çalışmaya dahil edilen 17 izolatın 10'u F-1 klonal kümesinde yer alırken, bu izolatların 8'i Hematoloji, 2'si ise Çocuk Kliniği'nde yatan hasta örneklerinden tespit edilmiştir. F-1 klonun kümede bulunan diğer 6 izolatın ise 2001 yılında 2 farklı yoğun bakım ünitesi ve bir klinikte üreyen suşlar ile aynı olması, bu klonun uzun süre hastanemizin farklı klinik ve yoğun bakım ünitelerinde baskın klon olduğunu göstermiştir. 2002 yılında F-1 klonal kümesi dışında kalan 7 izolat ise, 4 izolatlı F-9 ile 3 izolatlı F-10 klonal kümelerini oluşturmuştur. F-9 ve F-10 klonları da tamamı Hematoloji Kliniği'nde yatan hasta örneklerinden izole edilmiştir.

2003 yılındaki epidemi döneminde 9 izolatın bulunduğu F-5 klonunun, Çocuk Klinik ve Yoğun Bakım Ünitesi'nde baskın klon olduğu belirlenmiştir.

F-4 klonal kümede; 2001 yılında Çocuk ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitelerinde yatan hasta örneklerinde izole edilen 3 izolat ile 2003 yılında Hematoloji Kliniği'nde yatan 2 hasta örneğinde izole edilen 5 izolatın toplandığı belirlenmiştir. Yine F-7 klonal kümede de 2001 yılında Yanık Ünitesi'nde yatan 1 hasta örneğinde ve 2003 yılında Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatan 1 hasta örneğinden izole edilen 2 izolatın toplandığı tespit edilmiştir. F-4 ve F-7 klonlarının 2001 ve 2003 yıllarında farklı kliniklerde yatan az sayıdaki hasta örneğinden izole edilmiştir. Bu durum, F-4 ve F-7 klonlarının uzun süre varlığını sürdürdüğünü düşündürmekle birlikte, aynı türün içindeki sınırlı sayıdaki mutasyonlara bağlı olarak farklı klonların benzerliği şeklinde de yorumlanabilir.

2007 yılındaki epidemi dönemindeki suşların diğer epidemi dönemlerinde izole edilen suşlara benzemediği ve kendi içinde de farklı izolatların olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda farklı yıllarda meydana gelen epidemi dönemlerinde izole edilen 83 VR *E. faecium* suşunun klonal ilişkilerinin PFGE ile değerlendirilmesi sonucu; 2001 ile 2002 yılı epidemilerinde izole edilen birçok

suş arasında en az %85 benzerlik olması (aynı klon), bu klonun varlığını uzun süre koruduğunu ve bu iki epidemi döneminde hastanede baskın hale geldiğini göstermektedir. Diğer 3 epidemi dönemlerinde izole edilen suşlar arasında anlamlı bir benzerlik tespit edilmedi. Ancak aynı epidemi dönemlerinde izole edilen suşların kendi aralarında birbirlerine benzediği ve birkaç klonal kümede toplandığı belirlendi. Özellikle 2009 yılındaki epidemi döneminde tüm suşların tek bir kümede toplanması, daha önceki dönemlerde hastanede izole edilmeyen bu klonun, disseminasyon sonucu tüm hastaneye yayıldığını ve bu epidemiden sorumlu tek klon olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak; 9 yıllık periyot boyunca hastanemizde yatan hasta örneklerinde izole edilen tüm VRE'ler içinde *E. faecium* türünün %98'lik bir oranla baskın tür olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya alınan tüm suşların yüksek düzey glikopeptit direnci gösterdiği ve 5 ayrı dönemde epidemiyeye sebep olduğu tespit edilmiştir.

Nozokomiyal enfeksiyonların önlenmesi için gerek sağlık çalışanlarını, gerekse hasta ve hasta yakınlarını kapsayan önleyici rehberler düzenlenmeli ve bu rehberlere uyulması konusunda eğitim çalışmaları yapılmalıdır. Ayrıca VRE gibi nozokomiyal enfeksiyon etkenlerine yönelik aktif surveians yapılmalıdır. Bu surveians sırasında mikrobiyoloji laboratuvarları daha etkin bir şekilde kullanılmalı ve antibiyotik kullanım politikaları gözden geçirilmelidir.

### Teşekkür

İzolatların PFGE bant profillerinin dendrogram analizinde desteğinden dolayı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı çalışanı Dr. Alper Karagöz'e teşekkür ederiz.

\*Yazarlar herhangi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmadıklarını bildirmiştir.

|          |                                                                                                                                                                                    |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>C</b> | <b>İLETİŞİM İÇİN:</b> Faruk Karakeçili Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan. drfarukkarakecili@hotmail.com |
| <b>✓</b> | <b>GÖNDERİLDİĞİ TARİH:</b> 09 / 11 / 2016 • <b>KABUL TARİHİ:</b> 02 / 01 / 2017                                                                                                    |

### REFERENCES

- O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist* 2015; 8: 217-230.
- Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12: 1221-1236.
- Larru B, Gong W, Vendetti N, et al. Bloodstream infections in hospitalized children: Epidemiology and Antimicrobial Susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J* 2016; 35: 507-510.
- Heidari H, Emaneini M, Dabiri H, Jabalameli F. Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of Enterococcal strains isolated from burn patients. *Microb Pathog* 2016; 90: 93-97.
- Bhatt P, Patel A, Sahni AK, et al. Emergence of multidrug resistant enterococci at a tertiary care centre. *Med J Armed Forces India* 2015; 71: 139-144.
- Mittal S, Singla P, Deep A, et al. Vancomycin and high level aminoglycoside resistance in Enterococcus spp. in a tertiary health care centre: a therapeutic concern. *J Pathog* 2016; 2016: 8262561.
- Anderson AC, Jonas D, Huber I, et al. Enterococcus faecalis from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Microbiol* 2016; 6: 1534.
- Padmavathy K, Praveen S, Madhavan R, Krithika N, Kiruthiga A. Clinico-microbiological investigation of catheter associated urinary tract infection by Enterococcus faecalis: vanA Genotype. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: DD05-6.
- Chunhui C, Xiaogang X. Genetic characteristics of vancomycin resistance gene cluster in Enterococcus spp. *Yi Chuan* 2015; 37: 452-457.
- Yeşilbağ Z, Çağatay AA, Karadeniz A, et al. Is there a relationship between rectal colonization and nosocomial infection of patients in intensive care unit? *Mikrobiyol Bul* 2015; 49: 327-339.
- Besser J. Pulsed-field gel electrophoresis for disease monitoring and control. *Methods Mol Biol* 2015; 1301: 3-7.
- Garcia-Migura L, Pleydell E, Barnes S, Davies RH, Liebana E. Characterization of Vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates from broiler poultry and pig farms in England and Wales. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3283-3289.
- Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. Improved pulsedfield gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4242-4254.
- Aktaş G, Derbentli S. In vitro activity of daptomycin against VRE and MRSA strains. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48: 123-128.
- Karakeçe E, Çiftçi İH, Aşık G. Vankomisin dirençli enterokoklarda direncin moleküler yöntemlerle araştırılması. *ANKEM Derg* 2013; 27: 135-139.
- Uludağ Altun H, Ataman Hatipoğlu C, Bulut C, Eser OK, Demiröz AP. Comparison of GeneXpert® vanA/vanB PCR system and culture methods in the surveillance of vancomycin-resistant enterococci. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48: 538-544.
- Ochoa SA, Escalona G, Cruz-Córdova A, et al. Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant Enterococcus faecium isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. *BMC Microbiol* 2013; 13: 291.
- Yang JX, Li T, Ning YZ, et al. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis: A hospital-based study in Beijing, China. *Infect Genet Evol* 2015; 33: 253-260.
- Arsalan U, Demir E, Oryaşin E, et al. MLST types of vancomycin-resistant Enterococcus faecium strains isolated from blood cultures. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47: 432-441.
- Cheng VC, Chan JF, Tai JW, et al. Successful control of vancomycin-resistant Enterococcus faecium outbreak in a neurosurgical unit at non-endemic region. *Emerg Health Threats J* 2009; 2:e9.
- Brilliantova AN, Kliasovaa GA, Mironovaa AV, et al. Spread of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in two haematological centres in Russia. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35: 177-181.
- Coşkun FA, Mumcuoğlu I, Aksu N, et al. Phenotypic and genotypic traits of vancomycin-resistant enterococci in a public hospital: the first vanB-positive Enterococcus faecium isolates. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46: 276-282.