

BİR EĞİTİM HASTANESİNİN ÇOCUK KLİNİĞİNDE *vanA* GENOTİP *ENTEROCOCCUS FAECIUM* SALGINI

AN OUTBREAK OF *vanA* GENOTYPE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* IN PEDIATRIC CLINIC OF A TRAINING HOSPITAL

Abdullah KILIÇ¹, Orhan BEDİR¹, Turan TUNÇ², Bülent BEŞİRBELLİOĞLU³,
Can Polat EYİĞÜN³, Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU¹

¹ Gülhane Askeri Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
(abkiliic@gata.edu.tr)

² Gülhane Askeri Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

³ Gülhane Askeri Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Vankomisine dirençli enterokok (VDE) Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki ülkelerden ilk izole edilmesinden sonra, dünyadaki çoğu ülkeden artan oranlarda bildirilmektedir. 2008 yılı Mart ayının ilk haftasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi çocuk kliniğinde, hastane enfeksiyon kontrol komitesi tarafından vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VDEF) salgını tespit edilmiştir. VDEF izolatlarından biri nöroblastomalı hastanın idrar kültüründen, diğerleri nefrotik sendromlu bir hastanın idrar kültürü, rektal sürüntü örneği ve odasında bulunan kapı kolundan izole edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, çocuk kliniğinde salgına neden olan 4 VDEF izolatının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *vanA*, *vanB* ve *vanC-2* direnç genlerinin tespit edilmesi, "pulsed field gel electrophoresis (PFGE)" ve repetitif-PCR (rep-PCR) yöntemleriyle (DiversiLab, Biomerieux, Fransa) izolatlar arasındaki genotipik ilişkinin belirlenmesidir. Tüm izolatların, E-test (AB-Biodisk, Solna, İsveç) yöntemi ile vankomisin ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençli [minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) > 256 mg/L] olduğu; Phoenix (Becton Dickinson, ABD) sistemiyle ise streptomisin, gentamisin, ampisilin, eritromisin ve penisiline dirençli, tetrasiklin ve linezolid duyarlı olduğu bulunmuştur. PCR yöntemi ile tüm izolatlarda *vanA* geni tespit edilmiş, *vanB* ve *vanC-2* genleri ise saptanmamıştır. Hem PFGE hem de rep-PCR yöntemi ile enfeksiyona neden olan izolatların tek bir klona ait olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, VDE izolatlarının erken tespiti, suşların horizontal yayılımının önlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda, PFGE yöntemi ile karşılaştırıldığında, ticari rep-PCR sisteminin salgına neden olan izolatların tespit edilmesinde daha hızlı bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Vankomisine dirençli enterokok, nozokomiyal enfeksiyon, "pulsed field gel electrophoresis", repetitif-PCR, salgın.

ABSTRACT

Vancomycin-resistant enterococci (VRE) have been increasingly reported from most countries around the world following initial isolation from patients in United States and European countries. A vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) outbreak was determined by hospital infection control committee in the pediatric unit of Gulhane Military Medical Academy, Ankara, Turkey in the first week of March 2008. While one of the 4 VREF strains was isolated from urine culture of a patient with neuroblastoma, the remaining strains were isolated from cultures of urine and rectal swab samples of a patient with nephrotic syndrome and from the hospital room doorknob of this patient. Aims of this study were to determine antibiotic susceptibilities by E-test, to investigate the presence of *vanA*, *vanB* and *vanC-2* resistance genes by polymerase chain reaction (PCR), and to genotype the 4 strains by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and repetitive PCR (rep-PCR) (DiversiLab, bioMérieux, France). All isolates conferred high level [minimum inhibitor concentration (MIC) > 256 mg/L] vancomycin and teicoplanin resistance by E-test method. The isolates were also found resistant to gentamicin, streptomycin, ampicillin, erythromycin, penicillin and were susceptible to tetracycline and linezolid. The *vanA* gene was detected in all strains by PCR. It was demonstrated that the 4 VRE strains belonged to a single clone as shown by both PFGE and rep-PCR methods. Prompt and accurate detection of VRE and determination of the genotypes is of crucial importance to prevent horizontal transfer of the strains in the hospital. When compared with PFGE, the DiversiLab commercial rep-PCR seems to be a reliable and more rapid method to detect the genetic relationship between strains leading to an outbreak.

Key words: Vancomycin-resistant enterococci, nosocomial infection, pulsed field gel electrophoresis, repetitive-PCR, outbreak.

GİRİŞ

Vankomisine dirençli enterokoklar (VDE) ilk izole edildiği 1980'li yıllardan beri çoğu ülkede hastane kökenli enfeksiyonların önemli nedeni haline gelmiştir. 2003 yılı Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Ulusal Hastane Enfeksiyon Takip Sistemi verilerine göre yoğun bakım ünitelerinde VDE oranı %28.5 olarak bildirilmiştir¹. Avrupa ülkelerinde VDE oranı ABD'ye göre daha düşük olmasına rağmen özellikle 1990'lı yıllardan sonra çoğu Avrupa ülkesinde artan bir oranda bildirilmeye başlanmıştır². VDE salgınları özellikle immünyetmezlikli, bedensel-zihinsel özür lü ve çocuk hastaların buldukları kliniklerde meydana gelmektedir³. ABD, İngiltere ve İtalya gibi ülkelerde VDE salgınları diğer ülkeler ile kıyaslandığında nispeten sık oluşmakta ve salgın izolatları klonal yayılım göstermektedir⁴. Bu salgınların en önemli nedeni olarak aşırı ve uygunsuz antibiyotik kullanımı ile yetersiz hastane temizliği gösterilmektedir⁵.

VDE salgınları sıklıkla *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* tarafından oluşturulmaktadır. Diğer enterokok türleri ise daha ziyade sporadik olgulardan izole edilmektedir⁶. VDE izolatlarında şu ana kadar *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* ve *vanG* olmak üzere 6 farklı glikopeptid direnç genotipi tanımlanmıştır. Bunlar içinde salgınlarda özellikle *vanA* ve *vanB* genotip VDE izolatları izole edilmekte ve artan oranlarda bildirilmektedir. *VanB* genotip enterokoklar sadece vankomisine dirençli iken, *vanA* genotip enterokoklar hem vankomisine hem de teikoplanine karşı yüksek düzeyde direnç göstermektedir⁷.

Hastanemiz çocuk kliniğinde bir hafta içinde bir hastanın idrar ve rektal sürüntü örneği ile odasında bulunan tuvalet kapı kolundan, diğer bir hastanın idrar kültüründen van-

komisine dirençli *E.faecium* (VDEF) izole edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, izole edilen 4 izolatın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile direnç genlerinin tespit edilerek, "pulsed field gel electrophoresis (PFGE)" ve repetitif-PCR (Rep-PCR) yöntemleri ile izolatlar arasındaki genotipik ilişkinin ortaya çıkarılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar

2008 yılı Mart ayının ilk haftası içinde çocuk kliniğinde farklı katlarda yatan iki hastanın idrar kültüründen VDEF izole edildi. İdrar örnekleri MacConkey agar (Merck, Almanya) ve %5 koyun kanlı agar (Merck) plaklarına kantitatif olarak ekildi. Üreyen kolonilere Gram boyama, katalaz, eskülin hidrolizi, %40 safra tuzlu vasat ve %6.5 NaCl içeren vasatta üreme testleri yapıldı⁸. Gram-pozitif boyanan, katalaz negatif, eskülini hidrolize eden, %40 safra tuzlu ve %6.5 NaCl içeren ortamda üreyen izolatlar enterokok olarak tanımlandı ve ticari sistem kullanılarak (Phoenix, Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, ABD) tür düzeyinde tanımlandı.

Çevresel Örnekler

Aynı klinikte bulunan hasta, personel ve refakatçilerden rektal sürüntü örnekleri alındı. Ayrıca hastaların odalarında bulunan tıbbi cihazlar, çeşme suyu, banyo küveti, kapı kolu, çeşitli yüzeyler ve kullandığı malzemelerden sürüntü kültürü örnekleri alındı. Örnekler direkt olarak 6 mg/L vankomisin (Sigma, ABD) içeren Enterokokosel agar plaklarına (Becton Dickinson, ABD) ekildi. Plaklar 35°C'de inkübe edilerek 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirildi⁹. Şüpheli koloniler yukarıda belirtilen yöntemlerle tanımlandı⁸.

Duyarlılık Testleri

Vankomisin ve teikoplanin için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri, E-test (AB-Biodisk, Solna, İsveç) yöntemiyle üretici firmanın önerileri doğrultusunda belirlendi¹⁰. Diğer antibiyotikler için duyarlılık testleri ticari sistem kullanılarak (Phoenix, Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, ABD) yapıldı. Kontrol izolatları olarak *E.faecium* B7641 (*vanA*), *E.faecalis* V583 (*vanB*), *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC-2*) (Robin Patel'den sağlandı, ABD) ve *E.faecium* ATCC 6057 (glikopeptide duyarlı) kullanıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İzolatların DNA'ları kaynatma metodu ile izole edildi¹¹. *VanA* (gggaaacgacaattgc ve gtacaatgcgccgctta, 732 bp), *vanB* (tacctaccctgtctttgtgaagcc ve cttttccggctcgttttcttgatg, 263 bp) ve *vanC-2* [gtttttcttaagcctaagaagc(gt)g ve gtcacaagcaccgacagcacaag, 192 bp] primerleri kullanılarak enterokok türlerinde sırasıyla *vanA*, *vanB* ve *vanC-2* genleri araştırıldı^{12,13}. Otuz beş siklus PCR amplifikasyonu sonunda elde edilen ürünün 5 µl'si jel elektroforezde (%1.5 agarose, 1xTBE, 100 V) 100bp moleküler standart (K180-250 UL, Amresco, USA) kullanılarak yürütüldü. Jel etidyum bromür ile boyandı ve ultraviyole (Gel Doc 2000, BIO-RAD, USA) kullanılarak görüntüledi. Her bir örnek için PCR iki kez uygulandı.

PFGE Yöntemi

PFGE tiplendirme, Smal enzimi kullanılarak daha önce tanımlandığı gibi yapıldı¹⁴. Elektroforez TBE solüsyonunda (44.5 mM Trizma base, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA) CHEF-DR11 Drive Module (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel Hempstead, İngiltere) cihazında başlangıç zamanı 1 saniye ve bitiş zamanı 20 saniye olacak şekilde 21 saatte gerçekleştirildi. Jel etidyum bromür (0.5 µg/ml) ile boyandı ve fotoğraflandı (Gel Doc 2000, BIO-RAD, USA).

Repetitif-PCR (Rep-PCR) Yöntemi

İzole edilen DNA'lar uygun DiversiLab DNA Fingerprinting Kit [Enterokok (bioMérieux, Fransa)] kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda PCR işlemine tabi tutuldu. Öncelikle karışım 25 µl olacak şekilde, 50 ng genomik DNA, kitte bulunan primer çiftleri, 2.5 U AmpliTaq ve 1.5 µl 10xPCR tamponu ile karıştırıldı. Termal döngü cihazı parametreleri; başlangıç denatürasyonu 94°C'de 2 dakika, sonrasında 35 siklus olacak şekilde 94°C'de 30 saniye, 50°C'de 30 saniye, 70°C'de 90 saniye ve son olarak 70°C'de 3 dakika son uzama olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen rep-PCR ürünleri çiplere yerleştirildi ve çip temelli bir DNA fragman analizi yapan DiversiLab cihazına (bioMérieux, Fransa) yüklendi. Bantların analizi 1 saat içinde DiversiLab software 3.3 kullanılarak yapıldı. Her bir DNA örneği için jel görüntüsü, yüzde benzerlik oranları ve dendrogram raporu oluşturuldu. Örnekler ayırt edilemez (benzerlik > %97), benzer (benzerlik %95-97 arasında, 1-2 bant farkı) ve farklı (benzerlik < %95 ve > 2 bant farkı) olarak sınıflandırıldı¹⁵.

BULGULAR

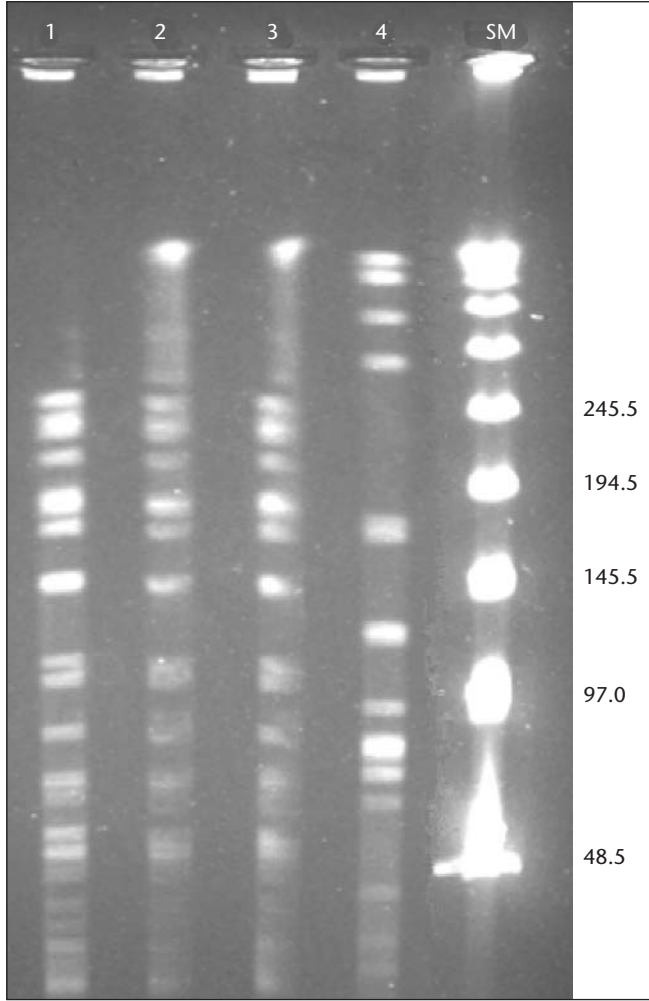
Çalışmamızda, bir hafta içinde biri nöroblastomalı, diğeri nefrotik sendrom (NS)'lu 2 hastanın idrar kültüründen ve ayrıca NS'li hastanın rektal sürüntü örneği ile odasındaki tuvaletin kapı kolundan VDEF izolasyonu yapılmıştır. Diğer tıbbi cihazlar, yüzeyler, dışkı örnekleri ve çalışan personelin ellerinden alınan örneklerden ise VDEF izole edilmemiştir.

Tüm izolatlar vankomisin ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençli (MIK > 256 mg/L) bulunmuştur. İzolatların ayrıca streptomisin ve gentamisine yüksek düzeyde dirençli, ampisilin, eritromisin ve penisiline dirençli, tetrasiklin ve linezolidde ise duyarlı olduğu belirlenmiştir.

İzolatların tümünde *vanA* geni pozitifliği tespit edilirken, *vanB* ve *vanC-2* genleri saptanmamıştır. PFGE ve rep-PCR yöntemleriyle salgına neden olduğu düşünülen izolatların Tenover kriterlerine¹⁶ göre aynı klona ait oldukları, rektal örnekten izole edilenin ise farklı olduğu belirlenmiştir (Resim 1, Şekil 1).

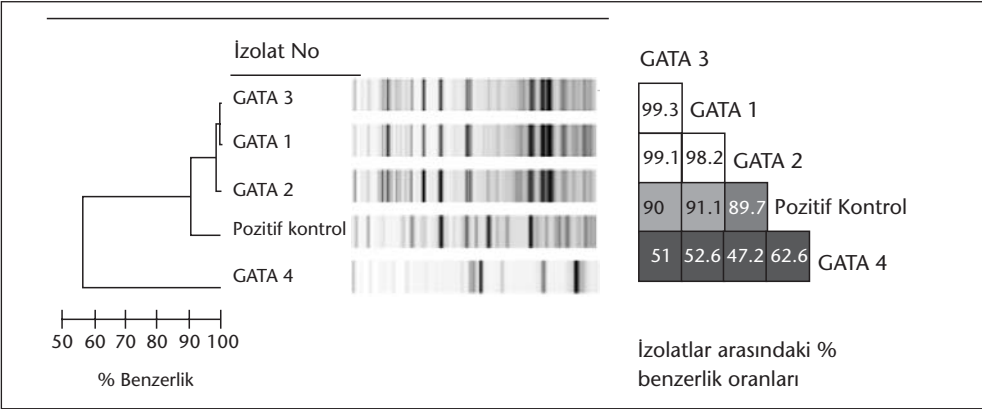
TARTIŞMA

Birçok antibiyotiğe dirençli olmaları ve sık olarak hastane enfeksiyonlarına neden olmalarından dolayı *E.faecium* izolatları çoğu merkezde halen sorun olmaya devam etmektedir. 1986 yılında Fransa ve İngiltere'de, 1988 yılında ABD'de oluşan VDE salgınlarından sonra dünyanın çeşitli ülkelerinden salgınlar bildirilmiştir¹⁷. VDE prevalansı, Türki-



Resim 1. Vankomisine dirençli enterokok izolatlarının *Smal* enzim kesimi ile elde edilmiş PFGE görüntüsü. Sıra 1: İkinci hasta idrar kültürü izolatu, Sıra 2: Birinci hasta idrar kültürü izolatu, Sıra 3: Birinci hasta tuvaleti kapı kolu izolatu, Sıra 4: Birinci hasta rektal sürüntü örneği izolatu. SM: Büyüklük belirteci (kilobaz).

ye’de hastane kökenli mikroorganizmalar arasında düşük kalmıştır. Avrupa VDE çalışma grubu verilerine göre 2000 yılına kadar *vanA* ve *vanB* genotip enterokok Türkiye’den bildirilmemiştir¹⁸. Avrupa ve ABD’de avoparsin gibi glikopeptid analogu olan antibiyotiklerin tarım endüstrisinde kullanılmasının *vanA* fenotip VDE izolatlarının artışından sorumlu olduğu düşünülmektedir¹⁹. Türkiye’de ise bu tür ilaçlar kullanılmamaktadır. Son zamanlarda VDE izolatlarının artışından, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve ampisiline dirençli enterokok gibi dirençli gram-pozitif mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde glikopeptid grubu antibiyotiklerin uygunsuz ve aşırı miktarda kullanılması sorumlu tutulmaktadır¹³.



Şekil 1. Repetitif PCR (DiversiLab) görüntüsü. GATA 1 (2. hasta idrar kültürü izolatu), GATA 2 (1. hasta idrar kültürü izolatu), GATA 3 (1. hasta tuvaleti kapı kolu izolatu), GATA 4 (1. hasta rektal sürüntü örneği izolatu).

Türkiye’de ilk VDE enfeksiyonu 2001 yılında hastanemizde tespit edilmiştir²⁰. Daha sonra Antalya²¹, Ankara¹³, Zonguldak²² ve tekrar Antalya’da¹⁷ VDE salgınları bildirilmiştir. Bizim hastanemizdeki ilk olgudan sonra, farklı zamanlarda 3 hastadan daha VDEF izole edilmiş ve aralarında klonal ilişki bulunamamıştır²³. Antalya’da ilk oluşan salgında bir yıl içerisinde 5 hastadan 12 VDE izole edilmiş ve bunların PFGE ile 5 farklı pulsotipe ayrıldıkları ve izolatların horizontal yayıldıkları bildirilmiştir²¹. Ankara’da bir çocuk kliniğinde oluşan salgında 25 hastadan 4 aylık süre içinde 25 VDE izole edilmiş ve PFGE ile 10 farklı pulsotipe ayrıldıkları ve yine horizontal yayılım gösterdikleri tespit edilmiştir¹³. Zonguldak’ta oluşan salgında ikisi yara kültürü, diğerleri rektal sürüntü örneğinden olmak üzere toplam 6 VDE izole edilmiş ve PFGE ile izolatların tek bir klona ait olduğu bildirilmiştir²². Yine Antalya’da 10 hastadan 5 aylık süre içinde 36 VDE izole edilmiş ve PFGE ile 4 farklı pulsotipe ayrıldıkları görülmüştür¹⁷. VDE izolatları hastanelerde ya plazmid ilişkili horizontal transfer ile ya da klonal yayılım ile salgın oluşturabilmektedir²¹. Çalışmamızda ilk VDE izolatu saptandıktan hemen sonra, hastane enfeksiyon kontrol komitesi (HEKK) ve izolasyonun yapıldığı kliniğin personel ve yetkilileri bilgilendirilmiş; HEKK tarafından gerekli önlemlerin alınması ile salgın kontrol altına alınmıştır²⁴. Erken dönemde tespit edilen salgınlarda genellikle izolatlar klonal yayılım gösterirken, geç dönemde tespit edilenlerde ise horizontal yayılım göstermektedir²⁵. Türkiye’de sadece Zonguldak bölgesinden bildirilen salgında klonal yayılım tespit edilmiş ve salgına erken müdahale edilmesinin etkili olduğu bildirilmiştir²². Bizim çalışmamızda da salgın oluşturan izolatların klonal olarak yayıldığı görülmüştür.

E. faecium hem Kuzey Amerika hem de Avrupa ülkelerinde vankomisin direncinin en sık olarak gösterildiği enterokok türüdür. Her iki kıtada da *E. faecium* izolatlarında *vanA* fenotip direnç, diğer fenotiplere göre daha yaygın olarak bulunmaktadır^{4,26}. Türkiye’de yapılan çalışmaların çoğunda da izole edilen VDE izolatlarının çoğunun *E. faecium* olduğu ve *vanA* fenotip ve genotip direnç gösterdikleri görülmüştür. Hastanemizde önceki yıllarda izole edilen 4 VDE izolatu da *vanA* fenotip olarak bildirilmiştir²³. Çalışmamızda,

önceki çalışmalarla uyumlu olarak izole edilen tüm VDE'lerin *E.faecium* olduğu ve *vanA* fenotip ve genotip direnç özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Araştırma ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında çeşitli genotipik metodlar kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin içinde PFGE yüksek ayırım gücünden dolayı altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntem tüm laboratuvarlar için standardize edilememiştir. Özellikle küçük ve birbirine yakın bantların ayırımında güçlükler oluşmakta ve sonuç yaklaşık 2-4 günde alınabilmektedir¹⁵. Rep-PCR yöntemi ise hızlı bir yöntem olup yaklaşık 4 saatte sonuç alınabilmektedir. Bu yöntem bakteri genomunda bulunan kodlanmamış tekrar eden diziler arasındaki bölgelerin amplifikasyonuna dayanmaktadır. Bu dizilerin boyutları her bakteri türü için özgüldür ve farklı türler arasında çeşitlilik göstermektedir. Son zamanlarda rep-PCR yöntemi bioMérieux firması tarafından otomatize ticari sistem olarak geliştirilmiştir²⁷. Çalışmamızda altın standart olarak bilinen PFGE yöntemi ile elde sonuçların rep-PCR ile uyumlu olduğu görülmüştür. DiversiLab ticari sisteminin PFGE yöntemine göre kısa süre içinde sonuç vermesinin salgına müdahale açısından önemli bir avantaj sağladığı düşünülmüştür. Sonuç olarak, tüm Türkiye'de olduğu gibi hastanemizde de *vanA* fenotip ve genotip VDE izolatları salgınlara neden olmaktadır. Salgınların erken tespit edilip müdahale edilmesi izolatların horizontal yayılımını önlemektedir. DiversiLab ticari sistemi özellikle zaman açısından salgına erken müdahalede önemli avantaj sağlayabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004; 32: 470-85.
2. Barbier N, Saulnier P, Chachaty E, Dumontier S, Andrement A. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1996; 34: 1096-9.
3. Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. J Antimicrob Chemother 2003; 3: 13-21.
4. 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; 3: 5-12.
5. Hoshuyama T, Moriguchi H, Muratani T, Matsumoto T. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) outbreak at a university hospital in Kitakyushu, Japan: case-control studies. J Infect Chemother 2008; 14: 354-60.
6. Kawalec M, Kedzierska J, Gajda A, et al. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect 2007; 9: 893-901.
7. Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Claverie-Martin F. A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 42: 273-7.
8. Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. 2003, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
9. Yang KS, Fong YT, Lee HY, et al. Predictors of vancomycin-resistant enterococcus (VRE) carriage in the first major VRE outbreak in Singapore. Ann Acad Med Singapore 2007; 36: 379-83.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 8th Informational Supplement. NCCLS Document M100-S8. 2000, NCCLS, Villanova, PA.
11. Bell JM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. J Clin Microbiol 1998; 36: 2187-90.

12. 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.
13. Kilic A, Demiray T, Saracli MA, et al: bacteriological characterization of vancomycin-resistant enterococci in a pediatric hospital in Turkey. *Ann Microbiol* 2004; 54: 543-51.
14. Morrison D, Woodford N, Barrett SP, Sisson P, Cookson BD. DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1084-91.
15. Fontana C, Favaro M, Minelli S, et al. *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates. *BMC Infect Dis* 2008; 8: 79.
16. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
17. Ergani-Ozcan A, Naas T, Baysan BO, et al. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric unit at a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1033-9.
18. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A. European VRE Study Group: prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 816-22.
19. Padiglione AA, Grabsch EA, Olden D, et al. Fecal colonization with vancomycin-resistant enterococci in Australia. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 534-6.
20. Basustaoglu A, Aydogan 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.
21. Colak D, Naas T, Gunseren F, et al. First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 397-401.
22. 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.
23. Kilic A, Senses Z, Aydogan H, Başustaoglu A. Molecular analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from clinical samples. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40: 295-9.
24. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 105-13.
25. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 686-707.
26. Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58: 163-70.
27. Ross TL, Merz WG, Farkosh M, Carroll KC. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5642-7.