

# Kan Kültürlerinden İzole Edilen Vankomisine Dirençli *Enterococcus faecium* Suşlarının MLST Tipleri\*

## MLST Types of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Blood Cultures

Uğur ARSLAN<sup>1</sup>, Esra DEMİR<sup>2</sup>, Erman ORYAŞIN<sup>2</sup>, Hatice TÜRK DAĞI<sup>1</sup>, İnci TUNCER<sup>1</sup>, Duygu FINDIK<sup>1</sup>, Bülent BOZDOĞAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

<sup>1</sup> Selçuk University Selçuklu Medical School, Department of Medical Microbiology, Konya, Turkey.

<sup>2</sup> Adnan Menderes Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Aydın.

<sup>2</sup> Adnan Menderes University Science and Technology Research and Practice Center, Aydın, Turkey.

\* Bu çalışma, "21<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Milan, Italy (May 7-10, 2011)" kongresinde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 10.08.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 28.03.2013

### ÖZET

Enterokoklar, özellikle de tedavi seçenekleri sınırlı olan vankomisine dirençli enterokoklar (VDE), önemli nozokomiyal patojenlerdir. Enterokoklar penisilinlere ve aminoglikozidlere düşük düzey direnç sahiptir ve sefalosporinlere intrinsek olarak dirençlidir. Ayrıca beta-laktam antibiyotiklere, aminoglikozidlere ve glikopeptidlere yüksek düzey direnç kazanabilir. Bu çalışmanın amacı 2003-2009 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen vankomisine dirençli *E. faecium* suşlarının glikopeptid direnç mekanizmalarını ve moleküler epidemiyolojik yöntemlerle genetik ilişkilerini belirlemektir. Çalışmaya kan kültürlerinde üreyen 38 VDE suşu alınmış; bakterilerin tanımlanması konvansiyonel yöntemler ve Phoenix 100 BD otomatize sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Systems, ABD) ile yapılmış ve 16S rRNA amplikon dizi analizi ile doğrulanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi CLSI önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Vankomisine direnç saptanan suşlarda E-Test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi ile vankomisin MK de-ğerleri belirlenmiştir. Vankomisin direnç genlerinden *vanA*, *vanB*, *vanC* ve *vanD* varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırılmıştır. Suşlar arasındaki klonal ilişki değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE) ve multilokus dizi tiplendirme (MLST) yöntemleri ile belirlenmiştir. Kan kültürlerinden izole edilen 38 enterokok suşu fenotipik yöntemlerle *E. faecium* olarak tanımlanmış ve 16S rRNA dizi analizi ile doğru-

**İletişim (Correspondence):** Doç. Dr. Uğur Arslan, Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 42075 Selçuklu, Konya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 332 241 1550, **E-posta (E-mail):** drarslanugur@gmail.com

lanmıştır. Suşların vankomisin MLK değeri E test ile  $> 256 \mu\text{g/ml}$  olarak saptanmıştır. Tüm suşlarda *vanA* geni pozitif olarak bulunmuştur. *vanA* geni taşıyan 38 *E.faecium* izolatının klonal ilişkisi PFGE yöntemiyle araştırılmış; her pulstotip ve alttiplerden MLST için seçilen örneklerle dizi analizi yapılmıştır. PFGE ile dört pulstotip (A-D) ve bir adet sporadik izolat saptanmıştır. Bu suşlardan 29'unun A pulstotipine, üçünün B pulstotipine, ikisinin C pulstotipine ve üçünün ise D pulstotipine ait olduğu belirlenmiştir. A pulstotipindeki 29 izolattan sekizi A1, dokuzu A2, altısı A3, ikisi A4 ve dördü A5 olarak tanımlanmıştır. MLST ile dört farklı dizi tipi (ST) saptanmış; 29 (%76.3) pulstotip A ve alttiplerinin ST117, üç (%7.9) pulstotip B'nin ST280, iki (%5.2) pulstotip C'nin ST18 ve üç (%7.9) pulstotip D'nin ST17 olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak hastanemizde VDE'nin etken olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarının ST117 tipinde hastaneye egemen bir suştan kaynaklandığı görülmüştür. Ancak bu suşun farklı pulstotiplerinin bulunması, uzun süreden beri hastanede mevcut olan suşun genetik farklılıklar oluşturduğunu göstermektedir. Bunun yanında minör pulstotiplere ait enfeksiyonlar da belirlenmiştir. Bu nedenle VDE'lere bağlı hastane enfeksiyonlarının yayılımının önlenmesinde ve kontrolünde direnç paternlerinin belirlenmesi ve klonal ilişkinin gösterilmesi önemlidir.

**Anahtar sözcükler:** *Vankomisine dirençli Enterococcus faecium; multilokus dizi tiplendirme; değişken alanlı jel elektroforezi.*

## ABSTRACT

Enterococci, particularly vancomycin-resistant enterococci (VRE), are important nosocomial pathogens with limited treatment options. Enterococci have low-level resistance to penicillins and aminoglycosides and are intrinsically resistant to cephalosporins. In addition, they can acquire high-level resistance to beta-lactam antibiotics, aminoglycosides and glycopeptides. The aim of this study was to determine glycopeptide resistance mechanisms and genetic relationships of vancomycin-resistant *E.faecium* strains isolated from blood cultures between 2003-2009 years by molecular epidemiologic methods. A total of 38 VRE strains isolated from blood cultures were included in this study. The isolates were identified by conventional methods and Phoenix 100 BD automated system (Becton Dickinson Diagnostic Systems, USA) and confirmed by sequence analysis of 16S rRNA amplicons. Antibiotic susceptibility tests were performed by the Kirby-Bauer disk diffusion method according to the CLSI standards. MIC values of vancomycin were determined in vancomycin resistant strains by E-test (AB Biodisk, Sweden) method. Vancomycin resistance genes included *vanA*, *vanB*, *vanC*, and *vanD* were investigated by polymerase chain reaction (PCR) method. Clonal relationship between strains was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Sequence analysis was performed for examples selected for multilocus sequence typing (MLST) of each pulstotype and subtype. Thirty eight strains of enterococci isolated from blood cultures were defined as *E.faecium* by phenotypic methods and confirmed by 16S rRNA sequence analysis. Vancomycin MIC values of strains were determined as  $> 256 \mu\text{g/ml}$  by E test. The *vanA* gene was detected in all isolates. Clonal relationship of 38 isolates *E.faecium* carrying the *vanA* gene was determined by PFGE and MLST methods. PFGE detected four pulstotypes (A-D) and one sporadic isolate. Twenty nine strains belonged to A pulstotype, three strains belonged to B pulstotype, two strains belonged to C pulstotype and three strains belonged to D pulstotype. Out of 29 isolates, eight strains were type A1, nine strains were type A2, six strains were type A3, two strains were type A4 and four strains were type A5. MLST identified four different sequence types (STs). Twenty nine A pulstotype and its subtypes belonged to ST117 (76.3%), three B pulstotype belonged to ST280 (7.9%), two C pulstotype belonged to ST18 (5.2%) and three D pulstotype belonged to ST17 (7.9%). In conclusion, bloodstream infections caused by VRE in our hospital arose from a dominant strain belonged to ST117. However, presence of different pulstotypes of this strain indicated that the strain had been present in the hospital for a long time and had accumulated genetic variations. In addition, infections caused by minor pulstotypes were also detected. Therefore for prevention and control of the spread of nosocomial infections caused by VRE, it is crucial to identify resistance patterns and clonal relationship of these organisms.

**Key words:** *Vancomycin-resistant Enterococcus faecium; multilocus sequence typing; pulsed-field gel electrophoresis.*

## GİRİŞ

İntestinal ve vajinal floranın üyesi olan enterokoklar uzun zaman düşük virölanslı patojenler olarak değeriendirilmiştirlerdir. Hastanelerde yoğun ve hatalı antibiyotik kullanımı sonucu başta beta-laktam ve aminoglikozid grubu olmak üzere glikopeptid türevi antibiyotiklere karşı yüksek düzey direnç geliştiren enterokoklar, yatan hastalarda bağırsak florasını ve anatomik yapıları bozan diğer kemoterapötiklerin de yardımıyla bağırsak lümeninden lamina propria'ya transloke olarak genel dolaşıma karışıp endojen kökenli bakteriyemi ve endokardite, bu hastaların kontamine çıkartıları ile temas sonucu da diğer hastalarda ekzojen kökenli hastane enfeksiyonlarına yol açarak morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden biri haline gelmiştir<sup>1,2</sup>.

Enterokoklar penisilinlere ve aminoglikozidlere düşük düzey dirence sahiptir ve sefalosporinlere intrensek olarak dirençlidir. Ayrıca beta-laktam antibiyotikler, aminoglikozidler ve glikopeptidler gibi antibiyotiklere de yüksek düzey direnç kazanabilir. Çoklu antibiyotik direnci özellikle yüksek düzey ampisilin ve aminoglikozidle birlikte vankomisin direnci artan sıklıkla rapor edilmektedir. Günümüzde yoğun bakımlardan izole edilen enterokokların %20'den fazlası vankomisine dirençlidir<sup>3</sup>.

Enterokoklar; genel olarak hastane enfeksiyonlarının dördüncü, üriner sistem ve cerrahi yara enfeksiyonlarının ikinci, kan dolaşımı enfeksiyonlarının ise üçüncü sıklıkta görülen patojenleridir<sup>4</sup>. Vankomisine dirençli *E.faecium* suşlarının insidansı Amerika Birleşik Devletleri'nde %20-40, bazı Avrupa ülkelerinde de %10'un üzerindedir. Avrupa'da en yüksek vankomisine dirençli enterokok (VDE) prevalansı (2007) Yunanistan ve Portekiz'de %45 olarak bulunmuştur<sup>5-7</sup>. Hastane kökenli VDE enfeksiyonlarının insidansındaki artış eğilimi, hastanın endojen florasında yer alan antibiyotiklere dirençli VDE'lerin, hastane şartlarında kullanılan dezenfektanlar ile ortamın nem, ısı ve kuruluğu gibi in vitro şartlara karşı da direnç geliştirerek, hastanede immün sistemi baskılanmış hastalar arasında kolaylıkla yayılmasına bağlanmaktadır<sup>4</sup>. Bu sebeple VDE'lere bağlı hastane enfeksiyonlarının yayılımının önlenmesinde ve kontrolünde, intestinal florasında VDE kolonizasyonu olan yatan hastaların erken tespiti ve hastane enfeksiyonu salgını ile ilişkilerinin gösterilmesi önemlidir.

VDE'lere bağlı hastane enfeksiyonlarında salgın suşları arasındaki ilişkinin saptanmasında önceleri biyokimyasal özellikler, antibiyotikleme, *western blotting* ve multilokus enzim elektroforezi (MLEE) gibi fenotipik özelliklere dayalı epidemiyolojik izlem yöntemleri kullanılmıştır. Ancak bu yöntemler, tekrarlanabilirlik ve ayırım güçlerinin düşük olması, pahalı ve zaman alıcı yöntemler olmaları gibi dezavantajları nedeniyle yerlerini daha yüksek ayırım gücüne sahip yüksek tekrarlanabilirlik özelliği gösteren moleküler epidemiyolojik yöntemlere bırakmışlardır. VDE kökenli hastane enfeksiyonlarında, salgın suşları arasındaki ilişkinin saptanmasında bu yöntemlerden; RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA), MLST (Multilocus sequence typing) ve PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) gibi genotipe dayalı moleküler epidemiyolojik yöntemler sık kullanılmıştır<sup>8-11</sup>.

Bu çalışmanın amacı 2003-2009 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen vankomisine dirençli *E. faecium* suşlarının glikopeptid direnç mekanizmalarını ve moleküler epidemiyolojik yöntemlerle genetik ilişkilerini belirlemektir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya 2003-2009 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında kan kültürlerinde üreyen VDE suşları alındı. Bakterilerin tanımlanması konvansiyonel yöntemler ve Phoenix 100 BD otomatize sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Systems, ABD) ile yapıldı ve 16S rRNA amplikon dizi analizi ile doğrulandı. Antibiyotik duyarlılık testi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile çalışıldı. Vankomisine direnç saptanan suşlarda E-Test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi ile firma önerileri doğrultusunda MİK değerleri belirlendi.

İzolatların genomik DNA izolasyonu için Instagen Matrix (BioRad, ABD) izolasyon kiti kullanıldı. Suşların 16S rRNA geni amplifikasyonu için 16S20 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') ve 16S1390 (5' GAC GGG CGG TGT GTA CAA 3') primerleri kullanıldı. 16S rRNA amplikonları Macrogen (Güney Kore) firmasına gönderilerek dizi analizi elde edildi. Dizileme iki yönde ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için kullanılan primerler yardımıyla yapıldı. 16S rRNA dizileri NCBI *Nucleotide Blast* programı kullanılarak *Gen Bank* ile karşılaştırıldı.

Vankomisin direnç genlerinden *vanA*, *vanB*, *vanC* ve *vanD* varlığı daha önce tanımlanan özgül primer çiftleri kullanılarak PCR yöntemiyle çalışıldı<sup>12</sup>.

PFGE çalışması Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde yapıldı. DNA izolasyonu ve deproteinizasyonu işlemleri için Murray ve arkadaşları<sup>13</sup> tarafından hazırlanan protokol uygulandı. Total DNA *SmaI* enzimi ile kesilerek %1'lik *pulsed-field* için hazırlanan agaroz içinde CHEF-DR III sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Belçika) 14°C'de ve 6 V/cm<sup>2</sup>'de 20 saat yürütüldü. Suşlar arasındaki bant farklılığı 5 banttı fazlaysa suşlar ayrı klonlar olarak değerlendirildi. Bant farklılığı 1-5 arasında ise ilişkili ve bir klonun varyantı, bant farklılığı yoksa aynı klon olarak değerlendirildi.

Çalışılan suştaki 7 gen (*atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS* ve *adk*) MLST web sayfasında belirtilen yöntemle göre çoğaltıldı (<http://efaecium.mlst.net/misc/info.asp>)<sup>14</sup>. Amplikonlara dizi analizi (Macrogen, Güney Kore) yapıldı. Her allel için DNA dizisinin analizi yapıldı ve genlerin allel tipleri belirlendi (<http://efaecium.mlst.net/sql/singlelocus.asp>). Belirlenen allel numaraları "<http://efaecium.mlst.net/sql/allelicprofilechoice.asp>" sayfasındaki programa girilerek suşun ST tipi tespit edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 38 enterokok suşu fenotipik yöntemlerle *E. faecium* olarak tanımlanmış ve 16S rRNA dizi analizi ile doğrulanmıştır. Suşların vankomisin MİK değeri E-test yöntemi ile > 256 µg/ml olarak saptanmıştır.

Vankomisine dirençli suşlarda direnç mekanizmasının tespiti için PCR ile direnç genlerinin varlığı araştırılmış ve tüm suşlarda *vanA* geni pozitif olarak bulunmuştur. Araştırılan diğer *van* genleri, (*vanB*, *vanC*, *vanD*) ise tüm suşlarda negatiftir.

Vankomisine dirençli ve *vanA* geni taşıyan 38 adet *E.faecium* izolatının klonal ilişkisi PFGE ve MLST yöntemleriyle araştırılmış ve PFGE ile 4 pulsotip (A-D) ve bir adet sporadik izolat saptanmıştır. Bu suşlardan 29'unun A pulsotipine, üçünün B pulsotipine, ikisinin C pulsotipine ve üçünün ise D pulsotipine ait olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında pulsotip A'nın farklı varyantlarının olduğu tespit edilmiştir. Toplam 29 A pulsotipli izolattan 8 suş A1, 9 suş A2, 6 suş A3, 2 suş A4 ve 4 suş A5 olarak tanımlanmıştır. Vankomisine dirençli *E.faecium* suşlarının klinik ve moleküler özellikleri Tablo 1'de, PFGE pulsotiplerine ait görüntüleri ise Resim 1'de verilmiştir.

Her pulsotip ve alt tiplerden MLST için seçilen örnekler dizi analizi yapılmış; 4 adet ST tipi saptanmıştır. Yirmi dokuz adet pulsotip A ve alttiplerinin ST117 (%76.3), 3 adet pulsotip B'nin ST280 (%7.9), 2 adet pulsotip C'nin ST18 (%5.2) ve 3 adet pulsotip D'nin ST17 (%7.9) olduğu belirlenmiştir.

## TARTIŞMA

Birçok antibiyotiğe karşı gerek doğal gerekse kazanılmış direnç göstererek sınırlı tedavi seçeneğine sahip olan, özellikle glikopeptid grubu antibiyotiklere direnci hareketli genetik elementlerle diğer bakterilere kolaylıkla aktarılabilen ve intestinal florada asemptomatik persistan kolonizasyon göstererek endojen kökenli enfeksiyonlara yol açabilen enterokokların, hastane enfeksiyonlarındaki önemi giderek artmaktadır<sup>15,16</sup>. Vankomisin direnci ilk olarak 1986 yılında İngiltere'de ve 1987 yılında Amerika'da bildirilmiştir ve tüm dünyada artan sıklıkla rapor edilmektedir. Türkiye'de ilk vankomisin dirençli *E.faecium* suşu 1998 yılında Antalya'da saptanmış ve bunu diğer bölgelerden yapılan bildirimler izlemiştir<sup>2,17</sup>.

Tüm dünyada gerek hastane enfeksiyonları gerekse kolonizasyonla ilgili olarak izole edilen VDE türleri arasında *E.faecium* oranının giderek arttığı dikkat çekmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle bakteriyemiye yol açan *E.faecium* izolatları arasında VDE oranının (%19), *E.faecalis* izolatları arasındaki VDE oranına (%4) göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir<sup>18</sup>. Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilen VDE izolatlarının hepsi 16sRNA dizi analizi ile *E.faecium* olarak tanımlanmıştır.

Enterokoklar glikopeptid antibiyotiklere *van* ilişkili genetik elementlerle (*vanA*, *B*, *D*, *E*, *G* ve *L*) çeşitli tiplerde direnç kazanabilirler. *VanA* hem vankomisine (64-> 1024 µg/ml) hem de teikoplanine (16-512 µg/ml) yüksek düzeyde dirence sebep olurken, *vanB* geni vankomisine düşük düzeyde (4-> 32 µg/ml) direnç gösterir ve teikoplanine (0.5-1 µg/ml) duyarlıdır. Avrupa ve Amerika'da *vanA* geni VDE'ler arasında başlıca direnç mekanizmasıdır ve çoğunlukla *E.faecium* suşlarında saptanmaktadır<sup>19,20</sup>. Ülkemizde en sık *vanA* tipi direnç tespit edilmektedir<sup>21</sup> ve çalışmamızda da tüm izolatların *vanA* geni taşıdığı belirlenmiştir.

Mikroorganizmaların epidemiyolojik özelliklerinin saptanması için izolatların tür düzeyinde tanımlanması ve direnç özelliklerinin belirlenmesinden sonra, moleküler epidemiyolojik yöntemlerle izolatlar arasındaki klonal ilişkinin gösterilmesi gereklidir. Günümüzde özellikle VDE salgınlarının epidemiyolojik özelliklerinin tespitinde farklı moleküler epi-

Tablo 1. Vankomisine Dirençli *E.faecium* Suşlarının Klinik ve Moleküler Özellikleri

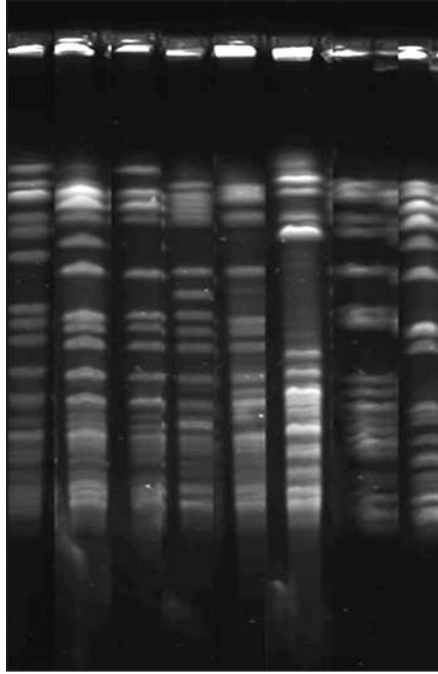
| İzolasyon<br>no | İzolasyon<br>yılı | Yaş | Cinsiyet | Tanı<br>(Altta yatan hastalık)       | Direnç<br>genotipi | PFGE<br>pulsotipi | MLST<br>alleli* | MLST<br>tipi |
|-----------------|-------------------|-----|----------|--------------------------------------|--------------------|-------------------|-----------------|--------------|
| 1               | 2003              | 2   | K        | Menenjit                             | Van A              | A2                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 2               | 2005              | 64  | K        | DM (Böbrek yetmezliği)               | Van A              | A2                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 3               | 2005              | 70  | K        | Kronik miyelositik lösemi            | Van A              | A2                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 4               | 2005              | 69  | K        | Intraserebral kanama                 | Van A              | A3                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 5               | 2005              | 68  | E        | Kalp kapağı replasmanı               | Van A              | C                 | 1-7-1-1-5-1-1   | ST18         |
| 6               | 2005              | 2   | E        | Menenjit                             | Van A              | C                 | 1-7-1-1-5-1-1   | ST18         |
| 7               | 2005              | 67  | E        | Nötropeni                            | Van A              | A3                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 8               | 2005              | 43  | E        | ASY                                  | Van A              | A3                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 9               | 2005              | 64  | E        | Siroz                                | Van A              | A3                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 10              | 2006              | 5   | E        | Epilepsi                             | Van A              | A3                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 11              | 2006              | 11  | E        | Akut lenfositik lösemi               | Van A              | D                 | 1-1-1-1-1-1-1   | ST17         |
| 12              | 2006              | 39  | K        | Intraserebral kanama                 | Van A              | A5                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 13              | 2006              | 75  | E        | ASY                                  | Van A              | A2                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 14              | 2006              | 75  | K        | Prömotoks (Serebrovasküler hastalık) | Van A              | A5                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 15              | 2006              | 44  | E        | İmplant sonrası enfeksiyon           | Van A              | A2                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 16              | 2006              | 67  | K        | ASY (Cerrahi alan enfeksiyonu)       | Van A              | B                 | 1-1-3-1-1-1-1   | ST280        |
| 17              | 2006              | 40  | E        | DM (ABY)                             | Van A              | A3                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 18              | 2006              | 43  | E        | ASY                                  | Van A              | A2                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 19              | 2006              | 44  | E        | ASY (Kolon kanseri)                  | Van A              | A2                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 20              | 2007              | 65  | K        | DM (Böbrek yetmezliği)               | Van A              | A4                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 21              | 2007              | 53  | K        | DM (DIC)                             | Van A              | B                 | 1-1-3-1-1-1-1   | ST280        |
| 22              | 2007              | 18  | K        | Epilepsi                             | Van A              | B                 | 1-1-3-1-1-1-1   | ST280        |
| 23              | 2007              | 54  | K        | Miyokard infarktüsü                  | Van A              | A4                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |
| 24              | 2007              | 36  | K        | Kronik böbrek yetmezliği             | Van A              | A1                | 1-9-1-1-1-1-1   | ST117        |

**Tablo 1.** Vankomisine Dirençli *E. faecium* Suşlarının Klinik ve Moleküler Özellikleri (Devamı)

| İzolat no | İzolasyon yılı | Yaş | Cinsiyet | Tanı (Altta yatan hastalık) | Direnç genotipi | PFGE pulstotipi | MLST alleli*  | MLST tipi |
|-----------|----------------|-----|----------|-----------------------------|-----------------|-----------------|---------------|-----------|
| 25        | 2007           | 27  | K        | Epilepsi                    | Van A           | A1              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |
| 26        | 2007           | 65  | K        | Menenjit                    | Van A           | A1              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |
| 27        | 2007           | 72  | E        | Diabetes insipidus          | Van A           | A1              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |
| 28        | 2007           | 78  | E        | Hipertansiyon (DM)          | Van A           | D               | 1-1-1-1-1-1-1 | ST17      |
| 29        | 2007           | 66  | E        | Servikal adenokarsinom      | Van A           | D               | 1-1-1-1-1-1-1 | ST17      |
| 30        | 2007           | 39  | K        | Kalp kapak hastalığı        | Van A           | A5              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |
| 31        | 2008           | 70  | K        | ASY                         | Van A           | A2              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |
| 32        | 2008           | 74  | E        | Intraserebral kanama        | Van A           | A2              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |
| 33        | 2008           | 67  | K        | DM (ABY)                    | Van A           | Singleton       | 3-1-3-1-1-1-1 | ST31      |
| 34        | 2008           | 54  | E        | Böbrek yetmezliği (DM)      | Van A           | A1              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |
| 35        | 2008           | 52  | E        | KOAH                        | Van A           | A5              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |
| 36        | 2008           | 2   | E        | Akut miyelositer lösemi     | Van A           | A1              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |
| 37        | 2008           | 6   | K        | Non-Hodgkin lenfoma         | Van A           | A1              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |
| 38        | 2009           | 24  | E        | DM (KOAH)                   | Van A           | A1              | 1-9-1-1-1-1-1 | ST117     |

\*Adk-atpA-dli-gdh-gyd-purK-pstS.

ABY: Akut böbrek yetmezliği; ASY: Akut solunum yetmezliği; DIC: Yaygın damar içi pıhtılaşması; DM: Diabetes mellitus; KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı.



**Resim 1.** Vankomisine dirençli *E.faecium* suşlarının Sma-I enzimi ile kesimin ardından oluşan PFGE pulsotiplerine ait örnekler.

demiyolojik yöntemler denenmesine rağmen, tekrarlanabilirlik, yüksek ayırım gücü ve kantite edilebilir sonuçlar vermesi nedeniyle PFGE yöntemi “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem farklı bakterilerle oluşan hastane enfeksiyonları salgınlarında, özellikle kısa süreli salgınlarda, salgın suşları ve kaynağın belirlenmesinde son derece yararlıdır<sup>22</sup>. Ancak elde edilen genotiplerin bölgesel olarak değerlendirilmesi ve diğer çalışmalarla karşılaştırılamaması en büyük dezavantajdır. MLST, *housekeeping* genlerin internal parçalarının DNA dizisindeki allelleri tanımlamaya dayalı bir yöntem olup, pek çok bakteri türünün virülans faktörlerinin ve moleküler epidemiyolojik özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Enterokoklarda MLST’nin, özellikle *E.faecium* suşlarının uluslararası veri bankasını oluşturmada uygun bir teknik olduğu sonucuna varılmıştır<sup>14</sup>.

Bizim çalışmamızda, hastanede yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen 38 *vanA* pozitif *E.faecium* suşunun klonal olarak ilişkili olup olmadığını belirlemek için PFGE; dizi tipini tespit etmek için ise MLST yöntemleri kullanılmıştır. PFGE yöntemiyle bir ana pulsotip (A), üç minör pulsotip (B, C, D) ve bir adet sporadik izolat saptanmıştır. Her pulsotip ve alttiplerden MLST için seçilen örneklerle dizi analizi yapılmış ve pulsotip A ve alttiplerinin ST117, pulsotip B’nin ST280, pulsotip C’nin ST18 ve pulsotip D’nin ST17 olduğu tespit edilmiştir. Bir adet sporadik izolat ise ST31 olarak belirlenmiştir. Hastanemizde en yaygın olan 29 suşun pulsotip A ve ST117 olduğu belirlenmiş ve Konya klonu olarak adlandırılmıştır. ST117 MLST tipi VD *E.faecium* suşunun hastanemizde altı yıl boyunca endemik olarak

bulunduğu görülmüştür. ST117 Almanya'daki çeşitli hastanelerde de tespit edilmiş ve özel-likle 1998-1999 yıllarında yaygın bir prevalansa sahip olduğu ifade edilmiştir<sup>23</sup>. Küba ve İspanya'da da ST117'nin etken olduğu sporadik hastane enfeksiyonları bildirilmiştir<sup>24,25</sup>.

Vankomisine dirençli *E.faecium*'lar arasında ST17 ve ST78 tiplerinin Avrupa ve Amerika'da yaygın olarak izole edildiği bildirilmiştir<sup>5,26</sup>. in'de yapılan bir çalışmada klinik örneklerden izole edilen VDE izolatları klonal ilişki yönünden PFGE ve MLST yöntemleri ile değerlendirilmiş ve izolatların heterojen bir dağılıma sahip olduğu görülmüştür. Yapılan MLST analizi sonucunda en yaygın ST tiplerinin ST17 (%34.6) ve ST78 (%18.5) olduğu-  
nu tespit etmişlerdir<sup>27</sup>. İzmir'de vankomisine dirençli *E.faecium*'un neden olduğu bir sal-  
gında, hematolojik malignitesi olan hastalardan izole edilen suşlarda ST17 ve ST78 tip-  
leri tespit edilmiştir. ST17 ve ST78 tüm dünyada sık rastlanan bir dizi tipi olup bizim a-  
lışmamızda D klonuna ait üç suşun ST17 tipinde olduğu belirlenmiş ancak ST78 saptan-  
mamıştır<sup>28</sup>. Çalışmamızda sporadik olarak saptanan bir suşun ST31 tipinde olduğu belir-  
lenmiştir. Ergani- zcan ve arkadaşları<sup>29</sup> tarafından yapılan bir çalışmada, yenidoğan yo-  
đum bakım  nitesinde VDE salgınında ana epidemik klonun ST31 olduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak, hastanemizde VDE'nin etken olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarının ST117 tipinde hastaneye egemen bir suştan kaynaklandığı görülmüştür. Ancak bu suşun farklı pul-  
sotiplerinin bulunması, uzun süreden beri hastanede mevcut olan suşun genetik farklılıklar  
oluşturduğuna işaret etmektedir. Bunun yanında minör pulsotiplere ait enfeksiyonlar da be-  
lirlenmiştir. Dirençli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların izlenmesinde ve  n-  
lenmesinde direnç genotipinin saptanması ve klonal ilişkinin gösterilmesi  nemlidir.

## KAYNAKLAR

1. Lewis CM, Zervos MJ. Clinical manifestations of enterococcal infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9(2): 111-7.
2. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 2000; 13(4): 686-707.
3. Vergis EN, Hayden MK, Choe JW, et al. Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. Ann Intern Med 2001; 135(7): 484-92.
4. Chou YY, Lin TY, Lin JC, Wang NC, Peng MY, Chang FY. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. J Microbiol Immunol Infect 2008; 41(2):124-9.
5. Stampone L, Del Grosso M, Boccia D, Pantosti A. Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1575-80.
6. Abele-Horn M, Vogel U, Klare I, et al. Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 2006; 44(11): 4009-13.
7. Werner G, Coque TM, Hemmerum AM, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Euro Surveill 2008; 13(47): pii: 19046.
8. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19(3): 512-30.
9. Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, et al. Intraspecies GenoMLC groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. Appl Environ Microbiol 2002; 68(3): 1381-91.
10. Descheemaeker P, Lammens C, Pot B, Vandamme P, Goossens H. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large GenoMicDNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. Intern J Syst Bacteriol 1997; 47(2): 555-61.

11. Saeed B, Hallgren A, Jonasson J, Nilsson LE, Hanberger H, Isaksson B. Modified pulsed field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. *APMIS* 2002;110(12): 869-74.
12. Yean CY, Yin LS, Lalitha P, Ravichandran M. A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin and bifunctional aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* species. *BMC Microbiol* 2007; 7: 112
13. Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol* 1990; 28(9): 2059-63.
14. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6): 1963-71.
15. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1988; 1(8575-6): 57-8.
16. 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.
17. Vural T, Şekercioğlu AS, Ögünç D ve ark. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *ANKEM* 1999; 13(1): 1-4.
18. 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.
19. Bourdan N, Fines-Guyon M, Thiolet JM, et al. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(4): 713-21.
20. DeLisle S, Perl TM. Vancomycin-resistant-enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest* 2003; 123(5 Suppl): 504-18.
21. Kilic A, Senses Z, Aydoğan H, Basustaoglu A. Molecular analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from clinical samples. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40(4): 295-9.
22. Akçimen B. Hastane infeksiyonlarından izole edilen vankomisin dirençli enterokokların pulsed field jel elektroforez yöntemiyle genotip tayini. *Uzmanlık Tezi*, 2010. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.
23. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24(12): 815-25.
24. Quinones D, Kobayashi N, Nagashima S. Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing. *Microb Drug Resist* 2009; 15(4): 287-93.
25. Valdezate S, Miranda C, Navarro A, et al. Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like:Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(4): 832-6.
26. Willems RJ, Top J, van Santen NM, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(6): 821-8.
27. Liu Y, Cao B, Gu L, Wang H. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci in a Chinese hospital between 2003 and 2009. *Microb Drug Resist* 2011; 17(3): 449-55.
28. Kirdar S, Sener AG, Arslan U, Yurtsever SG. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from hematological malignancy patients in a research hospital in Turkey, *J Med Microbiol* 2010; 59(6): 660-4.
29. 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(5): 1033-9.