

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde İzole Edilen Enterokok Türleri ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları

Aynur KARADENİZLİ(*) Fetiye KOLAYLI(*)

ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 144 enterokok suşunun türlerinin belirlenmesi ve antibiyotiklere dirençlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Tür ayrımı Streptococcus ID panel-Sceptor Otomasyon Sistemi (Becton Dickinson) ile yapılmıştır. Toplam 144 enterokok suşunun 93'ü (%64.6) *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*), 43'ü (%29.8) *Enterococcus faecium* (*E.faecium*), dördü *Enterococcus durans* (*E.durans*) / *Enterococcus hirae* (*E.hirae*), ikisi *Enterococcus raffinosus* (*E.raffinosis*), iki izolat da *Enterococcus casseliflavus* (*E.casseliflavus*) / *Enterococcus gallinarum* (*E.gallinarum*) olarak değerlendirilmiştir. Tüm suşların 38'inde (%26.4) Yüksek Düzey Gentamisin direnci (YDGD), 32'sinde (%22.2) de Yüksek Düzey Streptomisin Direnci (YDSD) saptanmıştır. Bu oranlar *E.faecalis* suşlarında sırasıyla %17.2 ve %16.1, *E.faecium* suşlarında ise sırasıyla %48.8 ve %34.9 bulunmuştur. Ampisilin direncinde beta-laktamaz üretiminin rolünün olup olmadığını belirlemek amacıyla nitrosefin testi ile suşların beta-laktamaz aktivitelerine bakılmış ve 144 enterokok suşunun hiçbirinde beta-laktamaz aktivitesi saptanmamıştır. Suşlar son yıllarda enterokokların tedavisinde büyük problem olan vankomisin direnci yönünden agar tarama yöntemiyle (NCCLS) incelenmiş ve vankomisine dirençli enterokok suşu belirlenmemiştir.

Sonuç olarak, hastanemizdeki tedavisinde özellikle yüksek düzey aminoglikozid direncine bakılmasının tedavinin başarırlı olmasında temel yaklaşım olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : Enterokok, yüksek düzey aminoglikozid direnci, vankomisin direnci, beta-laktamaz aktivitesi

SUMMARY

Enterococcus Species and Their Antibiotic Susceptibilities Isolated in Kocaeli University Medical Faculty

In this study, it was aimed to determine and to evaluate the antibiotic susceptibilities of the 144 enterococcus strains from various clinical specimen. The identification of strains at species level were done by using streptococcus ID Panel-Sceptor System (Becton Dickinson) (64,6%) were identified as *Enterococcus faecalis*, 43 (29,8%) as *Enterococcus faecium*, four as *Enterococcus durans*/ *Enterococcus hirae*, two as *Enterococcus raffinosus* and in rest of two strains, *Enterococcus casseliflavus* / *Enterococcus gallinarum*. High level gentamicin resistance (HLGR) and high level streptomycin resistance (HLSR) were found in 38 (26,4%) and 32 (22,2%) of the 144 Enterococcus strains, respectively. In *E.faecalis*, HLGR was in 17,2% and HLSR was in 16,1% in *E.faecium*, HLGR and HLSR were determined as 48,8% and 34,9% respectively.

Beta lactamase activity has been tested in the strains to determine whether it has role in ampicillin resistance. None of the strains showed beta lactamase activity. Vancomycin resistance has been studied with agar screening method according to the NCCLS and no resistance was detected.

In conclusion, treatment should be planned considering high level aminoglycoside resistance (HLAR) for better result.

Keywords: *Enterococcus*, high- level aminoglycoside resistance, vancomycin resistance, beta-lactamase activity

GİRİŞ

Enterokok türleri düşük virulansa sahip olmasına rağmen birçok ülkede nozokomiyal patojenler içinde giderek artan sıklıkta saptanmaktadır. Hastanede kazanılmış infeksiyonların yaklaşık %12'sinden sorumludurlar (1,2). Birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençli olmaları ve bazı türlerinin çoklu direnç göstermeleri tedavide güçlüğü neden olmaktadır. Yüksek

sek düzey aminoglikozid dirençli (YDAD), beta-laktamaz üreten ve vankomisine dirençli enterokoklar giderek artan oranda belirlenmektedir (3-5). Direnç türler arasında farklı sıklıkta görülmektedir. Bu nedenle enterokokların tür ayrımının yapılması daha da önem kazanmaktadır. Çalışmamızda hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole ettiğimiz enterokokların türlerinin identifikasyonu, YDAD'nin, vankomisin direncinin ve beta-laktamaz aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

(*) Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli

GEREÇ ve YÖNTEM

Mayıs 1998 ile Nisan 1999 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Bakterioloji Laboratuvarına gelen klinik örneklerden izole edilen enterokok suşları çalışmaya dahil edilmiştir. Toplam 144 enterokok suşunun 97'si idrardan (%67.4), 32'si yaradan (%22.2), dokuzu kandan (%6.3), beşi kataterden (%3.5) ve biri (%0.7) de beyin omurilik sıvısından izole edilmiştir. Enterokoklar; koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz testi, %6.5 NaCl'lü ortamda üreyebilme, esculini hidrolize edebilme ve PYR yapımı testleri ile tanımlanmıştır (6). Tür ayrımı Streptococcus ID panel-Sceptor Otomasyon Sistemi ile yapılmıştır. Tüm suşlarda beta-laktamaz üretiminin araştırılmasında "beta-laktamaz (Nitrocefin) Identification Sticks (Oxoid) kullanılmıştır.

YDAD ve vankomisin direnci National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS M100-S9)'in önerilerine göre tarama testi uygulanarak araştırılmıştır (7). Bunun için suşlar gentamisin 500 µg/ml, streptomisin 2000 µg/ml, vankomisin 6 µg/ml konsantrasyonlarında antibiyotik içeren Brain Heart Infusion agarda test edilmiştir. Her suşun 0.5 McFarland'a göre hazırlanan süspansiyonundan 10 µl alınarak antibiyotikli besiyerlerine spot ekim yapılmıştır. Gentamisin ve vankomisin direnci 24 saat sonra, streptomisin direnci ise 48 saat sonunda üreme olup olmadığına bakılarak değerlendirilmiştir. Bir koloni üzerindeki üremeler dirençli olarak kabul edilmiştir. Ampisilin direnci NCCLS'e göre Agar dilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır (7). Tüm uygulamalarda duyarlı kontrol suş olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kullanılmıştır.

BULGULAR

İzole edilen enterokok suşlarının tür analizinde, 93 suş (%64.6) *E. faecalis* ve 43 suş (%29.8) *E. faecium*

olarak tanımlanmıştır. Diğer enterokok türleri sekiz olguda (%5.6) izole edilmiş olup tür ayrımları Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tüm suşların 38'inde (%26.4) Yüksek Düzey Gentamisin Direnci (YDGD), 32'sinde (%22.2) de Yüksek Düzey Streptomisin Direnci (YDSD) saptanmıştır. Enterokok suşlarında Yüksek Düzey Aminoglikozid Direncinin (YDAD) antibiyotiklere göre farklılığı incelendiğinde, tek başına gentamisin direnci olan suş sayısı 19 (%13.2), tek başına streptomisin direnci olan suş sayısı 13 (%9.0), hem gentamisin hem de streptomisin direnci olan suş sayısı 19 (%13.2) olarak bulunmuştur. 93 *E. faecalis* suşunun 16'sında (%17.2) YDGD'i, 15'inde (%16.1) YDSD'i olup *E. faecium* suşlarında ise bu oranlar sırasıyla %48.8 ve %34.9 olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Enterokok suşlarının 109'u (%75.7) ampiciline duyarlı, 35'i (%24.3) ampiciline dirençli olarak bulunmuştur. En sık saptanan enterokok türlerine göre duyarlılık paternindeki değişiklikler Tablo 3'te belirtilmiştir.

Ampisilin direncinde beta-laktamaz aktivitesinin rolü olup olmadığı araştırılmıştır. Toplam 144 enterokok suşun hiçbirinde beta-laktamaz aktivitesi saptanmamıştır.

Ayrıca vankomisine dirençli enterokok suşu bulunmamıştır.

Tablo 1. Çalışmadaki enterokok suşlarının tür ayrımı ve oranları

Tür adı	Sayı	%
<i>E. faecalis</i>	93	64.6
<i>E. faecium</i>	43	29.8
<i>E. durans/E. hirae</i>	4	2.8
<i>E. raffinosus</i>	2	1.4
<i>E. casseliflavus / E. gallinarum</i>	2	1.4
Toplam	144	100.00

Tablo 2. Enterokok türlerine göre yüksek düzey aminoglikozid dirençleri

Yüksek Düzey Aminoglikozit Direnç Tipi	Enterokok türü				Diğer (n=8)Toplam			
	<i>E. faecalis</i> (n=93)		<i>E. faecium</i> (n=43)					
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
YDGD	7	7.5	11	25.6	1	12.5	19	13.2
YDSD	6	6.4	5	11.6	2	25.0	13	9.0
YDGD + YDSD	9	9.7	10	23.2	0	0.0	19	13.2
TOPLAM	22	23.6	26	60.4	3	37.5	51	35.4

TARTIŞMA

Enterokoklar üriner sistem infeksiyonu, nozokomi-
Tablo 3. Enterokok türlerine göre ampisilin direnci

Enterokok Türü	Ampisilin Direnci	
	Sayı	%
<i>E.faecalis</i> (n=9)	5	5.4
<i>E.faecium</i> (n=43)	29	67.4
Diğer (n=8)	1	12.5
TOPLAM (N=144)	35	24.3

yal bakteriyemi ve cerrahi yara infeksiyonu gibi birçok klinik tablodan sorumludurlar. Son yıllarda ise standart tedavilere dirençli suşlar artmaya başlamıştır (8-11). Enterokok türleri arasında da direnç özellikleri nedeniyle farklılıklar bulunmaktadır. Çalışmamızda izole edilen enterokok türleri *E.faecalis* (%64.6), ikinci sıklıkta ise *E.faecium* (%29.8) idi. Çalışmamızda olduğu gibi en sık etken olarak izole edilen *E.faecalis* genellikle antibiyotiklere daha duyarlı, fakat ikinci sıklıkla izole edilen *E.faecium* ise dirençli olması ile dikkati çekmektedir. Bu nedenle tür identifikasyonu özellikle tedavinin planlanmasında önemlidir (3). YDGD’i birçok yayında %1-48 olarak gösterilmiştir (3,12). Çalışmamızda bu direnç oranı %26.4 olarak bulunmuştur. Bu oran *E.faecium* suşlarında %48.9 olup literatür ile uyumlu göstermektedir (12). Tüm suşlarda %22.2 olarak bulunan YDSD’i *E.faecalis* türlerinde %16.1, *E.faecium* türlerinde ise %34.8 olarak saptanmıştır. Gentamisin ve streptomisine karşı direnç oranları farklı bulunmuştur. Bu durum farklı direnç mekanizmalarıyla inhibe edilmelerinden kaynaklanıyor olabilir. Bilindiği gibi YDAD’i genellikle aminoglikozidleri modifiye eden enzimlere bağlı meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra YDSD’de ribozomal mutasyon da etkili olmaktadır. YDGD’de ise bazan tek gen tarafından kodlanan bifonksiyonel bir protein olan AAC(6ç)-I/APH (2çç)-I rol oynamaktadır (13).

Enterokoklardaki penisilin direnci; beta-laktamaz ve beta-laktamaz dışı penisilin direnci olarak iki şekilde gerçekleşir. beta-laktamazlara bağlı penisilin direnci minimal inhibisyon konsantrasyonu veya disk difüzyon yöntemi gibi rutin duyarlılık testleri ile genellikle saptanamaz. Bunun saptanmasında bir kromojenik sefalosporin olan nitrosefin gibi spesifik bir beta-laktamaz testi kullanılarak penisilinaz yapımının test edilmesi önerilmektedir (14). Çalışmamızda ampisi-

lin direnci *E.faecalis* suşlarında %5.4, *E.faecium* suşlarında ise %67.4 gibi yüksek oranlarda bulundu. Bunun nedeni *E.faecium*’un beta laktam antibiyotiklere *E.faecalis*’ten daha az duyarlılık göstermesidir. Çünkü *E.faecium*’un penisilin bağlayan proteinleri antibiyotikler için belirgin şekilde düşük affinite taşırlar (15). Bu çalışmada ampisilin direncinin araştırılması amacıyla tüm klinik izolatlar nitrosefin testi ile beta-laktamaz aktivitesi yönünden araştırılmıştır. Beta-laktamaz aktivitesine sahip enterokok türü saptanmamıştır. Yurdumuzda yapılan çalışmaların aksine dünyada bazı ülkelerde enterokoklarda beta-laktamaz üretimine bağlı penisilin direnci olguları yayınlanmıştır (4,16). Çalışmamızda hiçbir suşun beta-laktamaz aktivitesi taşınamaması nedeniyle suşlardaki ampisilin direncinin düşük affiniteli penisilin bağlayan proteinlere bağlı intrinsik direnç yada kazanılmış bir direnç olabileceğini düşünülmektedir (15,17).

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde glikopeptid dirençli enterokoklara rastlanmaktadır (18,19). Çalışmamızda enterokoklarda vankomisin direnci bulunmamıştır. Bu da şimdilik hastanemizde tedavisinde büyük güçlükler yaşanan vankomisin dirençli enterokok probleminin olmadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, direnç paterninin türlere göre farklılık göstermesi nedeniyle enterokok infeksiyonlarının tedavisinin planlanmasında mutlaka tür ayırımının yapılması yanında olası direnç mekanizmalarının araştırılmasının da temel yaklaşım olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP: Major trends in the microbial aetiology of nosocomial infection, Am J Med 91(Suppl 3B): 72S (1991).
2. Eliopoulos GM: Increasing problems in the therapy of enterococcal infections, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 12:409 (1993).
3. Patterson JE, Sweeney AH, Simms M, Carley N, Mangi R, Sabetta J, Lyons RW: An analysis of 110 serious enterococcal infections: Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome, Medicine. 74:113 (1995).
4. Murray BE, Singh KV, Markowitz SM, Lopardo HA, Patterson JE, Zervos MJ, Rubaglio E, Eliopoulos GM, Rice LB, Goldstein FW: Evidence for clonal spread of a single strain of beta-lactamase-producing Enterococcus faecalis to six hospitals in five states, J Infect Dis 163:780 (1991).

- 5. Eliopoulos GM:** Increasing problems in the therapy of enterococcal infections, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12:409 (1993).
- 6. Koneman EW, Allen SD, Janda WM., Schreckenber PC., Winn WC:** The Gram positive Cocci Part II, Streptococci, Enterococci, and The "Streptococcus Like" Bacteria. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, p 577, 5th Ed., Lippincott- Raven Co, Philadelphia (1997).
- 7. National Committee for Clinical Laboratory Standards:** Performans standards for antimicrobial susceptibility testing; 9th informational supplement, M100-S9, (1999).
- 8. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS:** Multiple-drug resistant Enterococci: The nature of the problem and an agenda for the Future, *Emer Infect Dis* 4(2):714 (1998).
- 9. Emori TG, Gaynes RP:** An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory, *Clin Microbiol Rev*;6:428 (1993).
- 10. Jarvis WR, Gaynes RP, Horan TC, Emori TG, Stroud LA, Archibald LK, et al.:** Semiannual report: aggregated data from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system, *CDC*:1-27. (1996).
- 11. Haley RW, Culver DH, White JW, Meade WM, Emori TG, Munn VP, et al.:** The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals, *Am J Epidemiol* 121:182 (1985).
- 12. Schouten MA, Voss A:** Hoogkamp-Korstanje JAA and The European VRE Study Group: Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe, *J Antimicrobiol Chemother* 43:2542 (1999).
- 13. Ferretti JJ, Gilmore KS, Courvalin P:** Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6'-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Streptococcus faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities, *J Bacteriol* 167:631 (1986).
- 14. Barbara E. Murray, M.D:** Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci, *Emerging Infectious Dis* 4:102 (1998).
- 15. Williamson R, Le Bougunc C, Gutmann L, Horad T:** One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin, *J Gen Microbiol* 131:1933 (1985).
- 16. Çınar T, Leblebicioğlu H, Sünbül M, Eroğlu C, Esen Ş, Günaydın M:** Enterokoklarda Yüksek Düzey Gentamisin ve Streptomisin Direncinin Araştırılması, *Flora* 4:114 (1999).
- 17. Edmond MB, Ober JF, Dawson JD, Weinbaum DL, Wenzel RP:** Vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: natural history and attributable mortality, *Clin Infect Dis* 23:1234 (1996).
- 18. Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG:** Vancomycin-resistant enterococci, *Clin Microbiol Rev* 13:686 (2000).
- 19. Vural T, Şekercioğlu AS, Ögünç D, Gültekin M, Çolak D, Yeşilipek A, Ünal S, Kocagöz S, Mutlu S:** Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu, *ANKEM* 13:1 (1999).