

STAFİLOKOK VE ENTEROKOKLARDA ANTİBİYOTİK DUYARLILIK DENEYLERİNİN ÖZELLİKLERİ

Şengül DERBENTLİ

Characteristics of antimicrobial susceptibility testing in staphylococci and enterococci.

Stafilokok ve enterokoklar günümüzde sık rastlanılan hastane infeksiyonu etkenlerindedir. Bu bakterilerin sahip olduğu farklı antimikrobiyal direnç mekanizmaları, duyarlılık durumunun belirlenmesinde rutin antibiyotik duyarlılık deneylerinden farklı yöntemlerin uygulanmasını gerektirir.

STAFİLOKOKLARDA ANTİMİKROBİYAL DİRENCİ VE DUYARLILIK DENEYLERİNİN ÖZELLİKLERİ

1940'larda penisilin yaygın olarak kullanılmasını izleyerek stafilokoklarda penisilinaz üretimine bağlı penisilin direnci gelişmiş ve bu direncin yenilmesi amacı ile metisilin gibi penisilinaza dirençli penisilinler üretilmiştir. 1961 yılında metisilin kullanılmaya başlanmasından iki yıl sonra, metisiline dirençli *S.aureus* suşları ortaya çıkmıştır.

S.aureus'daki metisilin direnci kromozomal (intrasek) bir dirençtir ve PBP 2' veya PBP 2a olarak gösterilen ek bir PBP'in sentez edilmesi sonucunda ortaya çıkar. PBP 2a'nın başlıca özelliği metisiline ve diğer beta-laktam antibiyotiklerin çoğuna zayıf afinite göstermesi ve bu antibiyotiklerin varlığında bloke edilen diğer PBP'lerin fonksiyonunu üstlenerek hücre duvarı sentezini sürdürmesidir(3,4). Metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokoklarda da, bu antibiyotiğe dirençli *S.aureus* suşlarındaki PBP 2a'ya çok benzeyen ek bir proteinin bulunduğu ve bu proteinin de beta-laktam antibiyotiklere zayıf afiniteye sahip olduğu belirlenmiştir(16).

PBP 2a'nın sentezine ilişkin genetik bilginin, bakterinin kromozomunda yer alan *mecA* geninde bulunduğu ve bu genin metisiline duyarlı stafilokoklarca taşınmadığı bilinmektedir. *MecA* geninin ekspresyonuna bağlı olarak stafilokoklarda iki farklı tip metisilin direnci ortaya çıkar:

1- Homojen direnç: Bir bakteri popülasyonundaki tüm bakterilerin fonksiyonel *mecA* geni taşımaları durumunda ortaya çıkar. Bu tür direncin belirlenmesi çevre koşulları ile ilgili olmadığından, homojen direnç laboratuvarında kolayca belirlenir. Ancak bu tür dirence ender rastlanmaktadır.

2- Heterojen direnç: Tipik metisilin direncidir. Bir bakteri popülasyonundaki tüm bakterilerin *mecA* geni taşımalarına karşın, direnç sadece 10^4 - 10^8 bakteriden birinde görülür. Böyle hücreler 50 µg/ml metisilin varlığında bile üreyebilir. Aynı topluluktaki diğer hücreler ise, antibiyotiğin tıbbi açıdan kabul edilebilir konsantrasyonlarına, örneğin 1-5 µg/ml metisiline duyarlıdır. Heterojen direnç, besiyerinin içerdiği NaCl konsantrasyonu, pH, inkübasyon sıcaklığı ve süresi gibi ortam faktörlerinden etkilendiğinden, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan metisilin direnci belirleme yöntemlerinde optimal koşulların sağlanması gereklidir(3,4).

Beta-laktamaz üreten stafilokoklar penisilin, ampisilin ve amoksisiline dirençlidir. Metisilin gibi penisilinaza dirençli penisilinler bu suşlara etkilidir. Ancak fazla miktarda enzim üreten bazı suşlar metisilin kısmen parçalanması sonucunda bu antibiyotiğe direnç gösterirler. Bu tür dirence sınırda (borderline) direnç adı verilir. Ayrıca *mecA* geni taşımadığı ve beta-laktamaz

üretmediği halde metisilin direnci gösteren stafilocok suşları da belirlenmiştir. Intermediate direnç adı verilen bu direncin PBP 1,2 ve 4'deki değişiklikler sonucu, beta-laktam afinitesinin zayıflamasından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Sınırdaki direnç ve intermediate direnç metisiline ve diğer beta-laktam antibiyotiklere düşük düzeyde dirence neden olur (Tablo 1)(3,11).

Tablo 1. Stafilocoklarda penisilinaza dirençli penisilinlere direnç mekanizmalarına bağlı olarak gelişen fenotipler.

Direnç tipi	Minimum inhibitör konsantrasyon (µg/ml)	
	Oksasilin	Metisilin
Heterojen direnç	≥ 4	≥16
Sınırdaki (borderline) direnç	1-2	2-4
Intermediate direnç	1-2	4

Stafilocoklarda asıl metisilin direnci *mecA* geni ve onun ekspresyonu ile sentez edilen PBP 2a'nın varlığına bağlı olan dirençtir. Bu direncin belirlenmesinde sıklıkla disk difüzyon, buyyonda dilüsyon ve agar tarama yöntemleri kullanılmaktadır. Optimal koşulların sağlandığı deneylerde bile, bu yöntemlerin duyarlılığının % 100'e ulaşamaması, Vitek, Autobac gibi otomasyon yöntemlerinin her zaman güvenilir sonuçlar vermemesi gibi nedenlerle DNA prob ve PCR gibi moleküler biyolojik yöntemlerin kullanılması önerilmektedir(3,4,9,17,19). Ancak bu komplike yöntemler klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanamadıklarından, yukarıdaki yöntemlerden biri seçilmektedir. Bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllük oranları tablo 2'de gösterilmiştir(3).

Tablo 2. Metisiline dirençli stafilocokların belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüğü (%).

Yöntem	Duyarlılık		Özgüllük	
	S.aureus	KNS*	S.aureus	KNS
Disk difüzyon	95	95	80	80
Buyyonda dilüsyon	95	90	95	95
Agar tarama	95	95	95	95
Otomasyon sistemleri	75	75	95	95
DNA prob	99	99	99	95
PCR	99	99	99	99

* Koagülaz negatif stafilocok.

Stafilocoklarda metisilin direncinin belirlenmesi

Stafilocoklarda metisilin direncinin belirlenememesi tedavide başarısızlığa neden olur. Yanlış pozitif sonuç elde edilmesi ise gereksiz vankomisin kullanımına, yani toksik ve pahalı tedaviye yol açar. Bu nedenlerle duyarlılık deneylerinden en güvenli sonucun elde edilmesi hedeflenmeli ve aşağıda belirtilen hususlara dikkat edilmelidir:

1- Tüm duyarlılık deneylerinde(3,9,13,14);

a) Metisiline dirençli stafilocoklar 30-35°C'de metisiline duyarlı stafilocoklardan daha iyi ürediğinden, duyarlılık deneylerinde hazırlanan kültürler 35°C'de inkübe edilir. Metisilin direncinin büyük olasılıkla beklendiği durumlarda, inkübasyon 30°C'de de yapılabilir.

b) Metisiline dirençli stafilocoklar daha yavaş ürediklerinden, deney sonuçları en erken 24 saat sonra değerlendirilir.

c) Penisilinaza dirençli penisilinlerden oksasilin metisiline göre hem daha stabildir, hem de metisilin direncini belirleme yönünden daha üstündür. Nafsilin ise kan ve kan ürünü içeren besiyerlerinden etkilendiğinden kullanımı sınırlıdır. Bu nedenlerle bir hastanedeki endemik dirençli stafilokokların metisilin kullanılarak daha iyi belirlendiği saptanmadıkça, deneylerde oksasilin kullanımı önerilmektedir.

d) Deneyde kullanılacak bakteri inokulumu olarak; kanlı jeloz gibi bir non-selektif besiyerindeki 18-24 saatlik kültürde üreyen kolonilerden buyyon veya tuzlu suda hazırlanan ve ml'de belirli sayıda hücre içeren bakteri süspansiyonları kullanılır.

e) Metisiline dirençli stafilokoklar normal besiyerlerindekienden daha yüksek oranda NaCl içeren ortamlarda daha iyi ürerler. Bu nedenle deneylerde % 2 NaCl içeren Mueller-Hinton buyyonu ve % 4 NaCl içeren Mueller-Hinton agar kullanılır.

f) Birçok metisiline dirençli stafilokok suşu genellikle çoğul antibiyotik direnci gösterir ve diğer beta-laktamlara ek olarak aminoglikozidler, makrolidler, klindamisin, tetrasiklinler, klo-ramfenikol ve trimetoprim-sulfametoksazole de dirençlidir. Bu nedenle çoğul dirençli suşların metisiline de dirençli olabileceği düşünülmelidir. Sınırdaki dirençli stafilokoklarda ise genellikle çoğul direnç görülmez.

g) Metisiline dirençli *S.aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklar, in-vitro test sonuçları dikkate alınmaksızın tüm diğer penisilinlere, sefalosporinlere, amoksisilin-klavulanik asit, ampisilin-sulbaktam, tikarsilin-klavulanik asit, piperasilin-tazobaktam, sefoperazon-sulbaktam ve imipeneme dirençli olarak bildirilir.

h) Deneylerde kalite kontrolü için oksasiline duyarlı *S.aureus* ATCC 25923 ve oksasiline dirençli *S.aureus* ATCC 38591 suşları kullanılır.

2- Disk difüzyon deneyinde(1,3,9,13);

a) 1 µg'lık oksasilin (veya 5 µg'lık metisilin) diski kullanılır.

b) İnokulumdaki bakteri yoğunluğu 1×10^8 cfu/ml'dir. Bu yoğunluk 0.5 No'lu McFarland standardına eşittir.

c) Metisilin ile ≤ 9 mm, oksasilin ile ≤ 10 mm olarak belirlenen inhibisyon zonları metisilin direncini gösterir.

d) Deney sonucu okunurken inhibisyon zonunun kenarları dikkatle incelenmelidir. Duyarlı suşlarda sınırı belirgin inhibisyon zonları elde edilir. Buna karşın dirençli suşlarda üreme sınırını belirlemek zordur.

3- Buyyonda dilüsyon yönteminde(2,3,9,14);

a) İnokulumdaki bakteri yoğunluğu 5×10^5 cfu/ml'dir.

b) Oksasilin MİK'unun ≥ 4 µg/ml olarak belirlenmesi heterojen direnci gösterir (Tablo 1).

c) Direncin belirlenmesinde deneyin duyarlılığını arttırmak üzere 48 saatlik inkübasyon, % 5 NaCl'li besiyeri kullanma, 30°C'de inkübasyon, yüksek inokulum gibi alternatifler düşünülmüştür. Ancak bunlar beta-laktamaz üretimini arttırdığından, duyarlı suşların yanlışlıkla dirençli (veya sınırdaki dirençli) olarak yorumlanmasına neden olabilir, yani deneyin özgülüğünü azaltabilir. Öte yandan koagülaz negatif stafilokoklarda dilüsyon yöntemi ile metisilin direncinin belirlenmesi *S.aureus* suşlarına göre daha problemlidir. Koagülaz negatif stafilokoklarda beta-laktamaz üretimi dilüsyon deneyinin sonucunu belirgin olarak etkilemediğinden, bazı yazarlar bu bakteriler için inkübasyon süresinin 48 saat olmasının yararlı olacağını bildirmişlerdir.

4- Agar tarama yönteminde(3,10,23);

a) 6 µg/ml oksasilin ve % 4 NaCl içeren Mueller-Hinton agar kullanılır. Antibiyotikli besiyerleri sıkı kapalı paketler içinde 2-8°C'de en fazla 4 hafta muhafaza edilir. Oksasilinin aktivitesi kaybolabileceğinden, bundan daha uzun süre beklemiş besiyerleri kullanılmamalıdır.

b) 0.5 No'lu McFarland standardına göre ayarlanmış ve 1/100 oranında sulandırılmış bakteri süspansiyonu (1×10^6 cfu/ml)'ndan 10 µl alınarak nokta ekim yapılır.

c) Sonuç değerlendirilirken inokülasyon bölgesi dikkatle incelenmelidir. Bir tek koloninin bile ürememesi bakterinin duyarlı olduğunu gösterir.

d) Ender olarak bazı koagülaz negatif stafilokok suşları % 4 NaCl içeren besiyerinde üremeyebilir. Böyle suşların belirlenmesi için % 4 NaCl'li oksasilinsiz besiyerlerinde üreme kontrolü yapılmalıdır.

e) Agar tarama yöntemi *mecA* genine bağlı metisilin direncini ortaya çıkarır. "Intermediate" dirençli suşlar da bu besiyerinde üreyebilirler. Ancak sınırda dirençli suşlar genellikle üreyemediğinden, yanlışlıkla heterojen dirençli olarak yorumlanır.

Stafilokoklarda beta-laktamaz belirlenmesi

Stafilokok beta-laktamazlarının güvenli olarak saptanmasında nitrosefin esaslı deneyler önerilmektedir. Deneyde bakterinin bir non-selektif besiyerindeki saf kültürü veya petrideki benzer morfolojiye sahip 4-5 koloni ile çalışılır. Eğer bakteri bir indükleyici ajan ile karşılaşmamış ise ve deney, yapıldıktan sonraki 1 saat içinde negatif ise, bu suş beta-laktamaz negatif olarak kabul edilmemelidir. Çünkü bazı stafilokoklar için indüksiyon gerekebilir. Belirlenebilir düzeyde beta-laktamaz üretimini sağlamak üzere, bakteri bir beta-laktam ile karşılaştırılır. Bu amaçla 1 µg oksasilin diski etrafındaki inhibisyon zonunun kenarından alınan kültür ya da bir beta-laktam antibiyotik'in subinhibitör konsantrasyonunu (örneğin 0.25 µg/ml sefoksitin) içeren buyyondaki bir gecelik kültürü kullanılır(10,23).

Stafilokoklarda en sık rastlanılan beta-laktam direnç mekanizması, beta-laktamaz üretimidir. Ancak tek direnç yolu değildir. Bu nedenle pozitif beta-laktamaz deney sonucu suşun penisiline ve açilamino-, karboksi- ve üreido-penisilinlere dirençli olduğunu gösterir. Buna karşın negatif sonuç, suşun bu antibiyotiklere duyarlı olduğunu göstermez ve bir duyarlılık deneyinin yapılması gerekir. Penisilin ile yapılan mikrodilüsyon deneyleri beta-laktamaz oluşumuna bağlı olarak penisilin direnci gösteren stafilokokların belirlenmesinde yetersiz kalabilir. Çünkü bazı stafilokoklar deney sırasında az miktarda beta-laktamaz üretirler. Böyle durumlarda indüklenmiş suş ile beta-laktamaz deneyi yapılarak penisilin duyarlılığı doğrulanmalıdır(10,13,14,23).

ENTEROKOKLARDA ANTİMİKROBİYAL DİRENCİ VE DUYARLILIK DENEYLERİNİN ÖZELLİKLERİ

Enterokoklar son yıllarda nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak giderek daha sık karşılaşılan ve aynı zamanda antimikrobiyal maddelere direnç oranlarında önemli artışlar kaydedilen bakterilerdir. Aslında bu iki süreç birbirini güçlendirmekte, antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı ortamlarda duyarlı bakteriler elimine edilirken, dirençli enterokoklar seçilmekte ve yayılma olanağı bulmaktadır(6,7,15).

Enterokoklarda intrinsek ve kazanılmış direnç olmak üzere iki farklı tür antimikrobiyal direnci görülür.

1- İntrensek direnç

İntrensek direnç terimi türlerin tümünde var olan kromozomal direnci ifade eder. Enterokoklar penisilinlere ve sefalosporinlere intrinsek dirençlidir. Ayrıca aminoglikozidlere, klindamisin ve linkomisine de düşük düzeyde intrinsek direnç gösterirler.

Enterokoklar beta-laktam antibiyotiklere zayıf afinite gösteren PBP 5'i taşıdıklarından, bu antibiyotiklerin enterokoklar için MİK'ları yüksektir. Penisilin direnci bakteri tarafından oluştu-

ruhan PBP 5'in miktarı ve penisiline afinitesi ile doğru orantılıdır. Örneğin *E.faecalis* ile yapılan çalışmalarda, penisilinın MİK'u 2-8 µg/ml olarak belirlenmiştir, ki bu konsantrasyon birçok streptokok için olandan 10-100 kez daha yüksektir. Aynı özellik antibiyotik döneminden önceki izolatlarda da gösterilmiştir. Bu bulgular enterokokların beta-laktam antibiyotiklere intrinsek dirence sahip olduğunun bir kanıtıdır. Ayrıca imipenem de dahil olmak üzere beta-laktamların enterokoklar için MİK'larının birçok kat konsantrasyonu bile bakterisit etki sağlayamadığından, enterokoklar beta-laktamlara tolerandır(6,12,15).

Enterokoklar intrinsek olarak düşük düzeyde aminoglikozit direnci gösterirler. Bu direnç enterokok hücre duvarı aminoglikozit geçirgenliğinin zayıf olmasından kaynaklanmaktadır. İntrinsek dirence bağlı olarak enterokoklar için aminoglikozitlerin MİK'u 8-250 µg/ml arasındadır ve enterokok infeksiyonlarının tedavisinde tek başına kullanılmazlar. Penisilin, vankomisin gibi hücre duvarı sentezi inhibitörlerinin varlığında aminoglikozitlerin hücre içine geçişi belirgin olarak artar. Bu nedenle enterokok infeksiyonlarının tedavisinde, hücre duvarı sentezi inhibitörleri ve aminoglikozit kombinasyonları ile elde edilen sinerjizmden yararlanır. Penisilin-aminoglikozit sinerjizmi, sadece yüksek düzeyde aminoglikozit direnci göstermeyen *E.faecalis* suşlarında ortaya çıkar. *E.faecium* suşları genellikle penisilin ve aminoglikozitlere çok dirençlidir. Bu suşlarda yüksek düzeyde aminoglikozit direnci bulunmaması halinde de, penisilin ile sadece gentamisin ve streptomisin sinerjist etkili olabilir. Çünkü *E.faecium* suşları intrinsek olarak amikasin, kanamisin, tobramisin ve netilmisini modifiye eden 6'-asetiltransferaz enzimini oluşturur. Bu konuda yapılan tüm çalışmalar amikasin, tobramisin, kanamisin, sisomisin veya netilmisinin MİK'ları 2000 µg/ml'den düşük saptanan *E.faecium* suşlarında penisilin-aminoglikozit sinerjisinin belirlenmediğini bildirmişlerdir. Bu nedenle bir enterokok suşu tür düzeyinde idantifiye edilmemişse ve sinerjist antibiyotik kombinasyonunun kullanımı gerekli ise, mutlaka gentamisin ve streptomisin direnci ayrı ayrı aranmalıdır. Deneylerde gentamisin ve streptomisin kullanılmasının bir diğer nedeni, aminoglikozitler içinde en iyi etkili olmalarıdır(6,7,12,18,25).

2- Kazanılmış direnç

Enterokoklarda transformasyon görülmemekte, kazanılmış direnç transdüksiyon ve konjugasyon ile gelişmektedir. Enterokoklarda kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin ve penisilin (penisilinazla) ile, yüksek düzeyde klindamisin ve aminoglikozit direnci, kazanılmış dirence başlıca örnekleri oluşturur ve bunlar plazmit ve/veya transpozon aracılıdır. Ayrıca yüksek düzeyde penisilin direnci (penisilinaz oluşturmaksızın) ile, fluorokinolon direnci de görülebilmekte ve bunların muhtemelen mutasyonlar sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir(6,12).

Aminoglikozitlere kazanılmış direnç

Yüksek düzeyde aminoglikozit direnci iki farklı mekanizma ile meydana gelebilir.

a) Hedef molekülün değişmesi: Aminoglikozitlerin hücredeki hedefi ribozomlardır. Ribozomlarda antibiyotiğin bağlandığı molekül değişikliğe uğradığında antibiyotik etkisiz kalır. Yalnız streptomisine karşı gelişen ve transfer edilemeyen bu tür dirence ender olarak rastlanır.

b) Aminoglikozit modifiye eden enzimlerin sentezi: Transfer edilebildiğinden, hızla yayılabilen bu tür dirençte adeniltransferaz, fosfotransferaz ve asetiltransferaz enzimleri rol oynar. Bu yolla kazanılmış dirençte aminoglikozitlerin MİK'ları 2000 µg/ml'den daha yüksektir. Yüksek düzeyde gentamisin direnci gösteren enterokoklar genellikle bu grubun tüm üyelerine dirençlidir. Fakat diğer aminoglikozitlerden farklı bir enzim (aminoglikozit nükleotidiltransferaz) ile inaktive olan streptomisin ender de olsa bu genellemenin dışında kalır(6,12,18,20).

Penisilinlere kazanılmış direnç

Enterokoklarda beta-laktamaz oluşturma özelliği transfer edilebilir bir plazmitte kodlanmıştır ve genellikle yüksek düzeyde gentamisin direncini de aynı plazmit sağlar. Genetik prob çalışmaları bu özelliğin *S.aureus*'dan kazanıldığını göstermiştir. Enterokok beta-laktamazı penisilin, açilamino-, karboksi- ve üreidopenisilinleri hidrolize eder. Buna karşın penisilinaze dirençli yarı sentetik penisilinler, sefalosporinler ve imipeneme genellikle etkisizdir.

E.faecium hücre duvarı sentezi inhibitörlerine ve aminoglikozitlere *E.faecalis*'den daha dirençlidir. *E.faecium* suşlarının 1/3'ünün yüksek düzeyde penisilin direnci gösterdiği (MİK \geq 16 μ g/ml) ve aminoglikozit-penisilin kombinasyonlarının böyle suşlara bakterisit etkili olmadığı bildirilmiştir. Beta-laktamaz oluşturmadığı saptanan bu suşların yüksek düzeyde penisilin direnci PBP'lere bağlanmıştır(6,12,18,25).

Glikopeptit direnci

1988'den bu yana enterokoklarda glikopeptit direnci bilinmektedir. Başta *E.faecium* olmak üzere *E.faecalis*, *E.gallinarum* ve *E.casseliflavus* suşlarında gösterilen bu direnç VanA, VanB ve VanC olarak sınıflandırılmıştır(5,6,22). *E.faecium* ve *E.faecalis* suşlarında görülen VanA direnci plazmidde kodlanır ve transfer edilebilir. Hem vankomisine (MİK \geq 64 mg/ml), hem de teikoplanine (MİK \geq 16 μ g/ml) yüksek düzeyde direnç sağlanır ve bu direnç özellikle vankomisin varlığında indüklenir. 39 kDa'luk VanA membran proteininin sentezi ile ilgilidir. VanB direnci de *E.faecium* ve *E.faecalis*'de görülen, yalnız vankomisine düşük ya da yüksek düzeyde dirence (MİK=16-512 μ g/ml) neden olan, kromozomal ve indüklenebilir bir dirençtir. 39.5 kDa'luk VanB membran proteininin sentezi ile ilgilidir. *E.gallinarum* ve *E.casseliflavus*'a spesifik olan, transfer edilemeyen, indüklenmeyen VanC direnci yalnız vankomisine düşük düzeyde direnç (MİK=2-32 μ g/ml) sağlar. Vankomisine dirençli enterokoklar, aminoglikozitlerle kombinasyonlarında da sinerjizm direnci gösterirler(8,12).

Enterokoklarda duyarlılık deneylerinin özellikleri

Endokardit gibi sistemik enterokok infeksiyonları bir beta-laktam antibiyotik ya da vankomisin gibi hücre duvarı sentezi inhibitörü ve bir aminoglikozit (genellikle gentamisin veya streptomisin) kombinasyonu ile tedavi edilir. Bu kombinasyonlar sinerjist etkileşim göstererek, bakterisit etki meydana getirir. Ancak suş hücre duvarı sentezi inhibitörlerine dirençli veya aminoglikozitlere yüksek düzeyde dirençli ise, sinerjizm sağlanamaz ve kombinasyon tedavisi başarısız kalır. Bu nedenle sinerjiji önceden belirlemek üzere, hücre duvarı sentezi inhibitörlerine ve aminoglikozitlere direnç durumunun saptanması gereklidir(6,7,24).

Rutin çalışmalarda aminoglikozit direncinin belirlenmesinde hem gentamisin, hem de streptomisin kullanılır. Çünkü gentamisine dirençli enterokok suşları, farklı bir mekanizma ile direnç görülen streptomisin dışındaki diğer aminoglikozitlere de dirençlidir. *E.faecalis*'in gentamisine duyarlı suşları kanamisin ve amikasin dirençli olabilir. Tedavide amikasin kullanımı düşünüldüğünde, amikasin ile in-vitro deney sonuçları güvenilir olmadığından, yüksek düzeyde direnç kanamisin ile belirlenebilir(7,12).

Enterokoklarda yüksek düzeyde aminoglikozit direncinin saptanmasında agar dilüsyon, buyyonda dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri uygulanabilir (Tablo 3)(10,13,14,23).

Tablo 3. Enterokoklarda yüksek düzeyde aminoglikozit direncinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler.

Parametre	Agar dilüsyon	Buyyonda dilüsyon	Disk difüzyon
Besiyeri	BKİA*	BKİB**	MHA***
İnokulum	10 ⁶ cfu/nokta	5x10 ⁵ cfu/ml	0.5 McFarland
İnkübasyon	24 ^a saat	24 ^a saat	18-24 saat
Konsantrasyon			
Gentamisin	500 µg/ml	500 µg/ml	120 µg/disk
Streptomisin	2.000 µg/ml	1.000 µg/ml	300 µg/disk
Sonuç	Üreme yok: Duyarlı	Üreme yok: Duyarlı	6 mm zon: Dirençli 7-9 mm zon: Yorumlanamaz ^b ≥10 mm zon: Duyarlı

* Beyin kalb infüzyon agar

** Beyin kalb infüzyon buyyonu

*** Mueller-Hinton agar

a: Streptomisinli deneyde negatif ise 24 saat daha inkübe edilir.

b: Doğru karar için ek olarak agar dilüsyon veya buyyonda mikrodilüsyon yapılmalıdır.

Deneylerde kalite kontrolü için gentamisin ve streptomisine duyarlı *E.faecalis* ATCC 29212 ve her ikisine de dirençli *E.faecalis* ATCC 51299 suşları kullanılır. Disk difüzyon yönteminde sadece duyarlı suş kontrol olarak alınır ve gentamisin karşısında 16-22 mm, streptomisin karşısında 14-19 mm'lik zon beklenir(10,23).

Enterokoklarda penisilin veya ampisilin direncinin belirlenmesinde özel bir deney tarif edilmemiştir. PBP'lerin değişmesine bağlı olarak ortaya çıkan direnç MİK'ların yükselmesi ve daha küçük çaplı inhibisyon zonları ile gösterilebilir. Buyyonda dilüsyon deneylerinde katyon ilaveli Muller-Hinton buyyonunun kullanımı, 10⁷ cfu/ml yoğunluktaki bakteri inokulumu (rutin dilüsyon deneylerinden 100 kez daha yoğun), 35°C'de 16-24 saat inkübasyon önerilmektedir. Penisilin (veya ampisilin)'in MİK'u ≤8 µg/ml ise suş duyarlı, ≥16 µg/ml ise dirençli olarak yorumlanır. Yüksek düzeyde penisilin direncini belirlemek için ise, bu antibiyotiklerin bir tek konsantrasyonunun (64 µg/ml) kullanıldığı agar dilüsyon veya makrodilüsyon deneylerinden biri önerilmektedir. Penisilin MİK'u ≥64 µg/ml olan suşlar yüksek düzeyde penisilin direncine sahiptir. Disk difüzyon deneyinde 10 µg ampisilin diski çevresinde ≤16 mm'lik zon suşun dirençli, ≥17 mm'lik zon suşun duyarlı, 10 Ü penisilin diski çevresinde ≤14 mm'lik zon suşun dirençli, ≥15 mm'lik zon duyarlı olduğunu gösterir. Mikrodilüsyon ve disk difüzyon deneyleri gibi rutin deneylerle enterokoklarda beta-laktamaza bağlı penisilin direnci belirlenemez. Enterokok beta-laktamazlarının saptanmasında nitrosefin deneyleri ile güvenilir sonuç elde edilir. Enterokoklarda pozitif beta-laktamaz deney sonucu penisilinün yanısıra açilamino-, karboksi- ve üreidopenisilinlere de direnci gösterir(10,13,14,23).

Penisilin duyarlılığı, suşun aynı zamanda ampisilin, amoksisilin ve beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına da duyarlı olduğuna işaret eder. NCCLS bugün açilüreidopenisilinlerin bunların arasına katılmasını önermemektedir. Penisilin ve ampisiline dirençli enterokoklar açilüreidopenisilinlere ve imipeneme de dirençli olarak kabul edilir. Suşun penisiline duyarlı olması durumunda bile, ağır enterokok infeksiyonlarının tedavisinde yüksek dozların kullanılması gerekir. Bu özelliğin raporda dip not halinde bildirilmesi tavsiye edilmektedir(10,13).

Enterokoklarda vankomisin direncinin belirlenmesinde önerilen deney, agar tarama yöntemidir. Çünkü disk difüzyon ve otomasyon yöntemleri (Vitek, MicroScan vb.) düşük düzeyde vankomisin direncini belirleyememektedir. Disk difüzyon deneyinde inkübasyon süresi tam 24 saat olmalı ve vankomisin zonunda inhibisyon sağlandığını güvenle belirlemek üzere, uygun bir

ışık altında küçük koloniler ya da ince tabaka halindeki üreme dikkatle araştırılmalı ve bu deneyde saptanan orta duyarlılık, MİK belirlenerek doğrulanmalıdır. NCCLS vankomisin direnç sınırını, MİK \leq 4 μ g/ml duyarlı, 8-16 μ g/ml orta dirençli ve \geq 32 μ g/ml dirençli olarak belirlemiştir.

Agar tarama yönteminde 6 μ g/ml vankomisin içeren beyin kalb infüzyon agar kullanılır. Bakterinin 18-24 saatlik agar kültüründen 0.5 No'lu McFarland standardına uygun hazırlanan süspansiyonundan 1-10 μ l (10^5 - 10^6 cfu/nokta) alınarak nokta ekim yapılır. 35°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra sonuç okunur. Birden fazla sayıda koloni üremesi veya buğu gibi ince bir üremenin saptanması suşun dirençli olduğunu gösterir(10,21,23).

KAYNAKLAR

- 1- Acar JF, Goldstein FW: Disk susceptibility test "V Lorian (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine* 3. baskı" kitabında s.17, Williams and Wilkins, London (1991).
- 2- Amsterdam D: Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media "V Lorian (ed): *Antibiotics in Laboratory Medicine* 3. baskı" kitabında s.53, Williams and Wilkins, London (1991).
- 3- Chambers HF: Detection of methicillin-resistant staphylococci "RC Moellering (ed): *Infectious Disease Clinics of North America*" 7:425 (1993).
- 4- DeLencastre H, Sá Figueiredo AM, Urban C, Rahal J, Tomasz A: Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother* 35:632 (1991).
- 5- Dutka-Malen S, Blaimont B, Wauters G, Courvalin P: Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*, *Antimicrob Agents Chemother* 38:1675 (1994).
- 6- Herman DJ, Gerding DN: Antimicrobial resistance among enterococci, *Antimicrob Agents Chemother* 35:1 (1991).
- 7- Herman DJ, Gerding DN: Screening and treatment of infections caused by resistant enterococci, *Antimicrob Agents Chemother* 35:215 (1991).
- 8- Johnson AP, Uttley AHC, Woodford N, George RC: Resistance to vancomycin and teicoplanin: An emerging clinical problem, *Clin Microbiol Rev* 3:280 (1990).
- 9- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 4.baskı, s.609, JB Lippincott Co, Philadelphia (1992).
- 10- Leitch C, Boonlayangoor S: β -lactamase tests, tests to detect high-level aminoglycoside resistance in enterococci, tests to detect oxacillin (methicillin)-resistant staphylococci with an oxacillin screen plate, "HD Isenberg (ed): *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, Vol.1; J Hindler (Sec.ed): Antimicrobial susceptibility testing" kitabında 5.3, 5.4, 5.5, Suppl 1, Am Soc Microbiol, Washington (1992).
- 11- Montanari MP, Tonin E, Biavasco F, Varaldo PE: Further characterization of borderline methicillin-resistant *S.aureus* and analysis of penicillin-binding proteins, *Antimicrob Agents Chemother* 34:911 (1990).
- 12- Murray BE: The life and times of the enterococcus, *Clin Microbiol Rev* 3:46 (1990).
- 13- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, *Approved Standard M2-A5*, 5th ed, Vol.13, No.24, NCCLS, Villanova (1993).
- 14- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, *Approved Standard M7-A3*, 3th ed, Vol.13, No.25, NCCLS, Villanova (1993).
- 15- Neu HC: Antibacterial therapy: Problems and promises (Part 1), *Hospital Practice* 15:63 (1990).
- 16- Pierre J, Williamson R, Bornet M, Gutmann L: Presence of an additional penicillin-binding protein in methicillin-resistant *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* and *S.simulans* with a low affinity for methicillin, cephalothin and cefamandole, *Antimicrob Agents Chemother* 34:1691 (1990).
- 17- Raziğhi RA, Derbentli Ş: *Staphylococcus aureus* suşlarındaki metisilin direncinin belirlenmesinde mikrodifüzyon, disk difüzyon ve agar tarama yöntemlerinin karşılaştırılması, *ANKEM Derg* 8:62 (1994).

- 18- Rice LB, Eliopoulos GM, Wennersten C, Goldmann D, Jacoby GA, Moellering RC: Chromosomally mediated β -lactamase production and gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*, *Antimicrob Agents Chemother* 35:272 (1991).
- 19- Richard P, Meyran M, Carpentier E, Thabaut A, Drugeon H: Comparison of phenotypic methods and DNA hybridization for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol* 32:613 (1994).
- 20- Sahm DF, Torres C: Effects of medium and inoculum variations on screening for high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*, *J Clin Microbiol* 26:250 (1988).
- 21- Sahm DF, Olsen L: In vitro detection of enterococcal vancomycin resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 34:1846 (1990).
- 22- Shlaes DM, Etter L, Gutmann L: Synergistic killing of vancomycin-resistant enterococci of classes A, B and C by combinations of vancomycin, penicillin and gentamicin, *Antimicrob Agents Chemother* 35:776 (1991).
- 23- Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR: Special tests for detecting antibacterial resistance "PK Murray, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover (eds): *Manual of Clinical Microbiology* 6. ed. ASM Press, Washington (1995).
- 24- Tenover FC, Tokars J, Swenson J, Paul S, Spitalny K, Jarvis W: Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci, *J Clin Microbiol* 31:1695 (1993).
- 25- Torres C, Tenorio C, Lantero M, Zarazaga M, Baquero F: Detection of aminoglycoside-penicillin synergy against *Enterococcus faecium* using high-content aminoglycoside disks, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:878 (1995).