

VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROCOCCUS FAECIUM SUŞU*,**

Tümer VURAL,¹ Ali Osman ŞEKERCİOĞLU¹, Dilara ÖĞÜNÇ¹,
Meral GÜLTEKİN¹, Dilek ÇOLAK¹, Akif YEŞİLİPEK², Serhat ÜNAL³,
Sesin KOCAGÖZ³, Gönül MUTLU¹

ÖZET

Bronkopulmoner infeksiyon nedeni ile ampirik olarak vankomisin ve amikasin kombinasyon tedavisine başlanan 11 aylık erkek çocuktan 15 gün ara ile alınan iki ayrı plevra sıvısının kültürlerinden *Enterococcus faecium* suşları izole edilmiştir. Disk difüzyon yöntemi, tam otomatize API sistemi, Sceptor sistemi, E-test ve buyyonda mikrodilüsyon yöntemi ile suşlarda antibiyotiklere çoklu direnç saptanmıştır. Ayrıca izole edilen suşlarda yüksek düzeyde gentamisin direnci gözlenmiştir.

İzole edilen suşların vankomisin direnç tiplerini belirlemek için 1. ve 2. dejenere primerler kullanılarak PCR yöntemi ile amplifikasyon yapılmış ve jel elektroforezi ile Van A fenotipinde oldukları saptanmıştır. İki izolat kaynakları ve bütün özellikleri aynı olduğu için tek suş olarak kabul edilmiştir. Bu suş, ülkemizde vankomisin direncinin belgelendiği ilk enterokok suşudur.

SUMMARY

Vancomycin resistant Enterococcus faecium strain.

Enterococcus faecium strains were isolated from two pleural fluid samples taken with 15 days interval from a 11 month-old boy who was subjected to empirical treatment with vancomycin and amikacin combination for broncho-pulmonary infection. Multiple antibiotic resistance was detected by disk diffusion, fully automatic API system, Sceptor system, E-test and broth microdilution tests. Strains were also found highly resistant to gentamicin.

By PCR amplification by using 1. and 2. degenerated primers and gel electrophoresis, vancomycin resistance was found to be Van A phenotype in both strains. The two isolates were accepted as one strain due to the identity of the source and to the similarity in all properties. This strain is the first vancomycin resistant *Enterococcus* strain which has been proved in Turkey.

GİRİŞ

İnsan barsak florasında bulunan enterokok türleri, kazanılmış veya nozokomiyal infeksiyonlarda ajan patojen olabilirler. Özellikle son yıllarda enterokok türleri nozokomiyal infeksiyonlardan sıklıkla izole edilmektedir. Altta yatan başka bir hastalığın olması, uzun sü-

* 13. Türkiye Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (1-5 Haziran 1998, Antalya).

** Bu suş API 20 Strep paneli ile Akdeniz ve Hacettepe Üniversitelerinde *E. casseliflavus* olarak tanımlanmış ve 13. ANKEM Kongresi'nde 21 no.lu poster olarak bu isimle sunulmuştur. Daha sonra Sceptor panelli *E. faecium* sonucunu vermiş, bunun üzerine Harvard Üniversitesi'ne gönderilen suş *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Konuyla ilgili olarak bu makaleyi izleyen S. Kocagöz'ün yazısına bakılması.

1- Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

2- Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı, Antalya.

3- Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara.

re hastanede yatış, cerrahi girişimler, böbrek yetmezliği, yoğun bakım ünitelerinde tedavi, nozokomiyal enterokok infeksiyonları için risk faktörlerini oluşturmaktadır (4).

Enterokok türleri ile oluşan sistemik infeksiyonlarda, bir beta-laktam veya vankomisin gibi hücre duvarına etkili antibiyotik ve aminoglikozid grubu bir antibiyotiğin (gentamisin veya streptomisin) kombine tedavisi kullanılır (4). Son yıllarda bu mikroorganizmaların etken olduğu infeksiyonların tedavisi oldukça güçleşmiştir. Bu güçlüğü en önemli nedenleri enterokoklarda gelişen ve vankomisini de içine alan çoklu antibiyotik direncinin ve beta-laktamaz üretiminin ortaya çıkmasıdır (4,10).

Vankomisine dirençli enterokok suşu ilk kez 1980'li yılların sonunda bildirilmiştir (4). Enterokok türlerinde, dört tip vankomisin direnci mevcuttur:

1- Teikoplanin direncinin eşlik ettiği yüksek düzey vankomisin direnci: Van A tipi direnç.

2- Teikoplanine direnç olmadan, düşük veya yüksek düzey vankomisin direnci: Van B tipi direnç.

3- *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*'da görülen, intrinsek düşük düzey vankomisin direnci: Van C tipi direnç (4).

4- Teikoplanine düşük düzey direncin görüldüğü, vankomisin direnci: Van D tipi direnç (6).

Van A ve Van B direnç tipleri, sıklıkla *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde görülmekle birlikte, diğer türlerde de saptanabilir. Direnç genlerinin enterokok türleri arasındaki transferi, plazmidlerin veya transpozonların neden olduğu konjugasyon ile kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Enterokok türlerinde iki farklı konjugatif transfer sistemi vardır. Bunlardan birincisi, dar alanlı plazmidleri içerir ve sadece enterokok türleri arasında bulunur. Konjugatif transfer sisteminin ikincisinde rol oynayan geniş alanlı plazmidler enterokok türleri, streptokok türleri, *Staphylococcus aureus*, laktobasiller, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* ve diğer mikroorganizmalar arasında transfer edilebilirler (9).

OLGU VE YÖNTEM

Ateş ve deri döküntüleri şikayetleri ile SSK Hastanesi'ne yatırılıp, malignensi ön tanısı ve bronkopulmoner infeksiyon tanısı alan, bu nedenle Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Pediatri Servisi'ne sevk edilen 11 aylık erkek çocuğa, yapılan muayene ve laboratuvar bulguları sonucu malign histiositosis tanısı konmuştur. Hastadan 15 gün ara ile alınan iki plevra sıvısının % 5 koyun kanlı jeloz besiyerindeki kültürlerinde 24 saatte üreyen Gram olumlu, katalaz olumsuz kolonilerden elde edilen saf kültürler, safralı eskülinli besiyeri ve % 6.5 NaCl içeren besiyerine ekilmiştir. Her iki besiyerinde de üreyen bakteriler, enterokok türü olarak belirlenmiş ve API (BioMerieux) tam otomatize sisteminin API 20 Strep paneli *E. casseliflavus* sonucunu vermişse de Sceptor (Becton-Dickinson) sistemi kullanılarak *E. faecium* suşu olarak tanımlanmış, bu tanım Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi (Boston) tarafından doğrulanmıştır.

Tanımlanan iki *E. faecium* izolatının antibiyotiklere duyarlılıkları, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi, tam otomatize API sistemi, buyyonda mikrodilüsyon yöntemi ve E-test (AB Biodisk) ile, yüksek düzey gentamisin direnci NCCLS kriterlerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır.

Kontrol suşu olarak, vankomisin ve diğer antibiyotiklere duyarlı olan ve yüksek düzeyde gentamisin direnci göstermeyen *E. faecalis* ATCC 29212 kullanılmıştır.

İzolatların vankomisin direnç tipi 1. ve 2. dejenere primerler kullanılarak PCR amp-

lifikasyonu ve jel elektroforezi ile belirlenmiştir. İzolatlar genel vankomisin direncini ve Van A tipi genini belirleyici olmak üzere iki set primer ile polimeraz zincir reaksiyonu (Techne, Cambridge) ile taranmış, her ikisinde de hem vankomisin, hem de Van A direncine neden olan genlerin varlığı saptanmıştır.

BULGULAR

Hastanın iki ayrı plevra sıvısı örneğinden izole edilen bakteriler *E. faecium* olarak idantifiye edilmiş ve E-test dahil kullanılan dört yöntemle de vankomisini de içine alan çoklu direnç gösterdikleri, ayrıca gentamisine de yüksek düzeyde dirençli oldukları saptanmıştır. Denenen beş antibiyotığın izolatlar için minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) tabloda gösterilmiştir.

Tablo . Antibiyotiklerin *E. faecium* izolatları için MİK değerleri*.

Antibiyotik	MİK (µg/ml)
Vankomisin	256
Teikoplanin	64
Gentamisin	>512
Streptomisin	250
Ampisilin	128

*: İki izolat aynı sonuçları vermiştir.

Vankomisin direncine neden olan tüm genler için kullanılan 1. ve 2. dejenere primerler ile yapılan PCR amplifikasyonu ve jel elektroforezi ile iki *E. faecium* izolatında vankomisin direncinin Van A fenotipinde olduğu saptanmıştır.

İki örnekten elde edilen izolatlar aynı hastadan izole edildikleri ve tamamen aynı özellikleri gösterdikleri için tek suş olarak kabul edilmiş ve Türkiye’de izole edilen ve ile ilgili inceleme ile doğrulanan vankomisine dirençli ilk enterokok suşu olduğu için bildirilmiştir.

TARTIŞMA

Enterokok türlerinin birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmaları ve plazmid ve transpozon aracılığı ile kazanılmış direncin diğer suşlara da aktarılması, vankomisin de dahil olmak üzere antibiyotiklere çoklu direnç gösteren suşların hızla yayılmasına yol açmıştır (4). Hospitalize edilmiş ve uzun süre vankomisin tedavisi almış kişiler, vankomisine dirençli enterokok infeksiyonu gelişmesi açısından risk altındadırlar (2). Ayrıca, *Clostridium difficile* infeksiyonu (7), hastanın yaşı, altta yatan bir hastalığın varlığı, immün sistemin baskılanması ve cerrahi operasyonlar diğer risk faktörlerini oluşturmaktadır (1).

Saraiva ve arkadaşlarının (8) yaptıkları çalışmada, vankomisine dirençli enterokok suşlarının % 86’sının ampisilin ve penisiline dirençli, % 26’sının teikoplanine duyarlı, % 82’sinin ise yüksek düzey gentamisin direncine sahip olduğu belirlenmesine karşın, izole ettiğimiz vankomisine dirençli *E. faecium* suşunun, denenen tüm antibiyotiklere di-

rençli ve yüksek düzey gentamisin direncine sahip olduğu saptanmıştır.

Pattel ve arkadaşları (5), 100 enterokok suşunda PCR yöntemi ile vankomisin direnç tipini araştırmışlar, 63'ünde PCR ürünü elde etmişler, 10 suşda Van A, 30 suşda Van B, 12 suşda Van C-1, altı suşda Van C-2/3, bir suşda Van A+Van C-1 genleri saptamışlar, 4 suşda PCR ürünü tanımlayamamışlardır. Miele ve arkadaşları (3) ise, PCR yöntemi ile suşların % 56.7'sinde Van A, % 23.3'ünde Van B, % 20'sinde ise Van C direnç tipi saptamışlardır.

Yamane ve arkadaşları (11), mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisine direnç gösteren enterokok suşlarının agar dilüsyon veya E-test ile vankomisine direnç özelliklerinin araştırılmasını ve PCR yöntemi ile direnç tipinin saptanmasını önermişlerdir. Çalışmamızda, disk difüzyon, API otomatize sistemi ve mikrodilüsyon yöntemleri ile vankomisine dirençli olduğu saptanan *E. faecium* suşundaki vankomisin direnci E-test yöntemi ile doğrulanmıştır. İki dejenere primer kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonu ve jel elektroforezi ile de bu direncin Van A fenotipinde olduğu belirlenmiştir. Bu suş, bildiğimiz kadarı ile Türkiye'de vankomisin direncinin belgelendiği ilk enterokok suşu olmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1- Gerding DN: Is there a relationship between vancomycin-resistant enterococcal infection and Clostridium difficile infection? *Clin Infect Dis* 25: 206 (1997).
- 2- Mainous MR, Lipssett PA, O'Brien M: Enterococcal bacteremia in the surgical intensive care unit. Does vancomycin resistance affect mortality? The Johns Hopkins SICU study group, *Arch Surg* 132: 76 (1997).
- 3- Miele A, Bandera M, Goldstein BP: Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine Van genotype in enterococci and to study gene organization in Van A isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1772 (1995).
- 4- Murray BE: Diversity among multidrug-resistant enterococci, *Emerg Infect Dis* 4: 37 (1998).
- 5- Pattel R, Uhi JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR: Multiplex PCR detection of Van A, Van B, Van C-1 and Van C-2/3 genes in enterococci, *J Clin Microbiol* 35: 703 (1997).
- 6- Perichon B, Reynolds P, Courvalin P: Van D-type glycopeptide-resistant Enterococcus faecium BM4339, *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2016 (1997).
- 7- Roghmann MC, McCarter RJ, Brewink J, Cross AS, Morris JG: Clostridium difficile infection is a risk factor for bacteremia due to vancomycin resistant enterococci (VRE) in VRE-colonized patients with acut leukemia, *Clin Infect Dis* 25: 1056 (1997).
- 8- Saraiva H, Jones RN, Erwin M, Sader HS: Evaluation of antimicrobial sensitivity of 87 clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci, *Rev Assoc Med Bras* 43: 217 (1997).
- 9- Simjee S, Gill MJ: Gene transfer, gentamicin resistance and enterococci, *J Hosp Infect* 36: 249 (1997).
- 10- Tsaor SM, Chang SC, Luh KT, Hsieh WC: Antimicrobial susceptibility of enterococci in vitro, *J Formos Med Assoc* 92: 547 (1993).
- 11- Yamane N, Miyagawa S, Nakasone I, Sakamoto F, Tosaka M: Laboratory-evaluation of antimicrobial susceptibility testings to detect vancomycin-resistant enterococci, *Rinsho Byori* 45: 381 (1997).