

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN ENTEROKOK SUŞLARININ VANKOMİSİN VE YÜKSEK DÜZEY AMİNOGLİKOZİD DİRENÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

Selma GÖKAHMETOĞLU, Bülent SÜMERKAN, Duygu EŞEL,
Selma KARAGÖZ

ÖZET

Ardışık 30 kan kültüründen izole edilen enterokok suşlarının 21 (% 70)'i *Enterococcus faecium*, 9 (% 30)'u *Enterococcus faecalis* olarak tanımlanmıştır. Enterokokların β -laktamaz aktivitesi nitrocefim içeren disklerle araştırılmış ve hiçbirinin β -laktamaz enzimi içermediği anlaşılmıştır. Enterokok suşlarında vankomisin direnci E-test yöntemiyle, yüksek düzey aminoglikozid direnci ise E-test ve disk difüzyon yöntemleriyle incelenmiştir. Disk difüzyon yöntemiyle yüksek düzey aminoglikozid direncinin araştırılması için 120 μ g gentamisin ve 300 μ g streptomisin içeren diskler hazırlanmıştır. İzole edilen suşların tümü vankomisine duyarlı bulunmuştur. Yirmi bir *E. faecium* suşunun 15 (% 71)'inde E-test ve disk difüzyon yöntemleriyle yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direnci saptanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile E-test karşılaştırıldığında *E. faecium* suşlarında iki yöntem arasında tam uyum belirlenirken, *E. faecalis* suşlarında disk difüzyon yöntemiyle streptomisin için iki suşta, gentamisin için ise bir suşta minör hata belirlenmiştir. Hastanemizde vankomisine dirençli enterokok suşuna rastlanmamıştır. Ayrıca sonuçlarımız, enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci saptanmasında 120 μ g gentamisin ve 300 μ g streptomisin içeren diskler kullanılarak yapılan disk difüzyon yönteminin ucuz ve uygun bir yöntem olduğunu göstermektedir.

SUMMARY

Investigation of vancomycin and high level aminoglycoside resistance among enterococci isolated from blood cultures.

Twenty one (70%) of enterococci isolated from 30 consecutive blood cultures were identified as *E. faecium* and 9 (30%) as *E. faecalis*. The β -lactamase production of enterococci was tested with nitrocefim disks. No β -lactamase producing strains of enterococci were found. Vancomycin resistance in enterococci was investigated with E-test, the high level aminoglycoside resistance was screened with E-test and disk diffusion method. Disks were loaded with 300 μ g streptomycin and 120 μ g gentamicin for investigation of high level aminoglycoside resistance with disk diffusion method. All of the strains were susceptible to vancomycin. Fifteen of 21 (71%) *E. faecium* strains were high level resistant to gentamicin and streptomycin with E-test and disk diffusion methods. When the results obtained by E-test and disk diffusion methods were compared, although there was 100% agreement between two methods in *E. faecium* strains, minor errors were found in two of *E. faecalis* strains for streptomycin and in one of them for gentamicin with disk diffusion method. There was no vancomycin resistant enterococci in our hospital. Our results show

* XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde sunulmuştur (4-9 Ekim 1998, Antalya).

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

wed that disk diffusion method performed with high content aminoglycoside disks (120 µg gentamicin, 300 µg streptomycin) was a convenient and cheap method.

GİRİŞ

Son yıllarda enterokoklara bağlı hastane infeksiyonlarında önemli derecede artış olmuştur. Enterokoklar üzerine dikkatlerin yoğunlaşması sadece hastane infeksiyonlarına sıklıkla neden olmalarından değil, aynı zamanda birçok antimikrobik ilaca belirgin ve artan derecede direnç kazanması nedeniyledir. Enterokoklarda vankomisin direncinin görülmesi, yüksek düzeyde aminoglikozid direncinin giderek yaygınlaşması, enterokok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (1).

Bu çalışmada kan örneklerinden izole edilen enterokokların identifikasyonu, β-laktamaz aktiviteyi, vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozid direncinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca yüksek düzey aminoglikozid direncini saptamada disk difüzyon ve E-test yöntemleri karşılaştırılarak disk difüzyon yönteminin rutin laboratuvar uygulamalarındaki yeri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ekim 1997 - Mart 1998 arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesi'nde incelenen kan örneklerinden izole edilen 30 enterokok suşu çalışmaya alınmıştır.

Kan örneklerinde üreyen, safra-eskülin deneyi pozitif, pyrolidonyl arylamidase (PYR) pozitif, % 6.5'lük NaCl'de üreme pozitif, katalaz negatif, Gram pozitif 30 kok enterokok olarak tanımlanmış ve BBL Crystal Gram-pozitif paneli (Becton Dickinson) ile tür tanımlaması yapılmıştır.

Enterokokların β-laktamaz aktivitesi nitrosefin (Difco) içeren disklerle araştırılmıştır. β-laktamaz testinde pozitif kontrol suşu olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu kullanılmıştır.

Enterokoklarda vankomisin direnci E-test (AB Biodisk) yöntemi ile, yüksek düzey aminoglikozid direnci ise E-test ve disk difüzyon yöntemleriyle incelenmiştir (9). E-test yönteminde vankomisin, yüksek düzey streptomisin ve gentamisin içeren stripler kullanılmıştır. Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direncini disk difüzyon yöntemi ile belirleyebilmek için Oxoid firmasından elde edilen blank diskler kullanılarak 300 µg streptomisin, 120 µg gentamisin içeren diskler hazırlanmıştır. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu disklerin kontrolü için kullanılmıştır (9). Bakterilerin saf kültürlerinden Mc-Farland 0.5 bulanıklığına eşdeğer süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan steril eküvyonlar aracılığı ile 4 mm kalınlığında dökülen Mueller-Hinton agar besiyerlerine sürülmüş ve 10-15 dakika sonra besiyerleri üzerine vankomisin, streptomisin ve gentamisin içeren E-test şeritleri, streptomisin (300 µg) ve gentamisin (120 µg) içeren diskler yerleştirilmiştir. E-test şeritlerini içeren plaklar 35°C'de 24 saat inkübe edilirken, diskleri içeren plaklar 35°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. E-testler için okuma sırasında üretici firmanın önerileri doğrultusunda inhibisyon zonunun antibiyotikli şeridi kestiği noktadaki antibiyotik konsantrasyonunu minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak kabul edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. E-test ile vankomisin MİK'i 4 µg/ml'ye eşit ve daha küçük olanlar duyarlı, MİK'i 32 µg/ml ve daha büyük olanlar dirençli suşlar olarak tanımlanmıştır. E-test ile MİK'i 500

$\mu\text{g/ml}$ 'den büyük olanlar yüksek düzeyde gentamisin dirençli, MİK'i 2000 $\mu\text{g/ml}$ 'den büyük olanlar yüksek düzeyde streptomisin dirençli olarak tanımlanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile yüksek düzey gentamisin ve streptomisin her ikisi için zon çapı 10 mm ve daha büyük olanlar duyarlı, 7-9 mm arasında olanlar orta duyarlı, 6 mm'ye eşit olanlar dirençli olarak belirlenmiştir (9). E-test ve disk difüzyon yöntemleri karşılaştırılmıştır.

BULGULAR

İncelenen 30 enterokok kökeninden 21 (% 70)'i *E. faecium*, 9 (% 30)'u *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Nitrosefin diskleriyle yapılan β -laktamaz testinde suşların β -laktamaz enzimi içermediği anlaşılmıştır. İzole edilen enterokok suşlarının tümü vankomisine duyarlı bulunmuştur. İncelenen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında vankomisin için MİK₅₀ ile MİK₉₀ değerleri ve MİK aralıkları tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Vankomisin enterokok suşları için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ve MİK aralığı ($\mu\text{g/ml}$).

Tür	Sayı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı
<i>E. faecium</i>	21	1	2	0.5 - 2
<i>E. faecalis</i>	9	2	2	1 - 2

E. faecium izolatlarının 15 (% 71)'inde E-test ve disk difüzyon yöntemleriyle yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direnci saptanmıştır. E-test yöntemiyle 9 *E. faecalis* izolatının üçünde yüksek düzey streptomisin direnci, ikisinde yüksek düzey gentamisin direnci belirlenmiştir. *E. faecalis* suşlarında disk difüzyon yöntemiyle streptomisin için iki suşta, gentamisin için ise bir suşta minör hata (duyarlı veya dirençli suşların orta duyarlı olarak yanlış yorumlanması) saptanmıştır.

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarında E-test ve disk difüzyon yöntemleri ile belirlenen yüksek düzey gentamisin ve yüksek düzey streptomisin direnç durumları tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Enterokok suşlarında E-test ve disk difüzyon yöntemleri ile belirlenen yüksek düzey streptomisin ve gentamisin direnci.

Tür	E-test		Disk difüzyon			
	YDSD	YDGD	YDSD	YDGD	Orta duyarlı Strep.	Genta.
<i>E. faecium</i> (n:21)	15*	15	15	15	0	0
<i>E. faecalis</i> (n: 9)	3	2	1	1	2	1

* Suş sayısı; YDSD: Yüksek düzey streptomisin direnci; YDGD: Yüksek düzey gentamisin direnci.

Disk difüzyon yöntemi ile yüksek düzey aminoglikozid direnci belirlenirken 24 ve 48 saat inkübasyon karşılaştırıldığında, direnç durumunda bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

TARTIŞMA

Enterokoklarda, antibiyotiklere direnç türden türe değişmektedir. Kaynaklarda *E. faecium*'un *E. faecalis*'e kıyasla antibiyotiklere daha dirençli bir tür olduğu bildirilmektedir (5,8). Bu çalışmada 30 enterokok izolatının 21 (% 70)'i *E. faecium*, 9 (% 30)'u *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Gelişken ve arkadaşlarının (3) 1996 yılında hastanemizde yaptıkları çalışmada 126 enterokok izolatının % 91'i *E. faecalis*, % 6'sı *E. faecium* olarak tanımlanmıştır.

β -laktamaz üreten enterokok suşları nitrosefin testi ile anlaşılabilir (9). Bu çalışmada kan kültüründen izole edilen 30 enterokok suşunun β -laktamaz aktiviteleri nitrosefin diski ile araştırılmış ve suşların β -laktamaz enzimi içermediği saptanmıştır. Bartoloni ve arkadaşlarının (1) yaptığı çalışmada da 189 kan kültüründen izole edilen enterokok suşlarının nitrosefin testiyle β -laktamaz enzimi içermediği tespit edilmiştir. Jones ve arkadaşlarının (5) yaptığı çalışmada 2000 enterokok izolatının sadece ikisinde β -laktamaz enzimi bulunmuştur.

Enterokoklarda görülen glikopeptid direnci kaygı vericidir. Çeşitli ülkelerden vankomisine dirençli enterokoklar bildirmektedir (2,10). Ülkemizde Vural ve arkadaşları (14) plevra sıvısından vankomisine dirençli *E. casseliflavus* suşu izole etmişlerdir. Vankomisine dirençli kökenlerin çoğunluğunu *E. faecium* oluşturmakta, ancak *E. faecalis* ve diğer enterokok türlerinde de bu dirence rastlanmaktadır (1,6). Jones ve arkadaşlarının (5) yaptığı çalışmada 2000 enterokok izolatının 87 (% 4,4)'ünde vankomisine direnç saptanmıştır. 1996 yılında hastanemizde yapılan bir çalışmada vankomisine dirençli enterokok suşuna rastlanmamıştır (3). Bu çalışmamızda da 30 kan kültüründen izole edilen enterokok suşunun hepsi vankomisine duyarlı bulunmuştur.

Yüksek düzey aminoglikozid direncinin giderek yaygınlaşması, enterokokların neden olduğu, aminoglikozidlerden sinerjik etki beklenen infeksiyonların tedavisinde önemli bir sorundur. Çünkü böyle bir direncin varlığında penisilin ve aminoglikozid kombinasyonunun etkisi ortadan kalkar. Bu nedenle enterokoklar ile oluşan endokardit gibi ağır infeksiyonlarda yüksek düzey aminoglikozid direncinin belirlenmesi gerekmektedir (7).

Kan kültürlerinden izole edilen enterokoklarda yapılan bir çalışmada *E. faecalis* suşlarında yüksek düzey gentamisin direnci % 44, yüksek düzey streptomisin direnci % 40 bulunurken, aynı çalışmada *E. faecium* suşlarında yüksek düzey gentamisin direnci % 21, yüksek düzey streptomisin direnci % 79 olarak saptanmıştır (1). Bir çalışmada enterokok bakteriyemili 93 hastanın 31 (% 33)'inden yüksek düzey gentamisin direnci olan enterokok suşları izole edilmiştir (4). Gelişken ve arkadaşlarının (3) hastanemizde yaptıkları çalışmada *E. faecalis* suşlarında yüksek düzey gentamisin direnci % 62, yüksek düzey streptomisin direnci % 20 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada *E. faecium* suşlarında yüksek düzey gentamisin direnci % 63 oranında saptanırken, yüksek düzey streptomisin direnci tespit edilmemiştir.

Torres ve arkadaşlarının (13) yaptığı çalışmada *E. faecium* suşlarında yüksek düzey aminoglikozid direncini saptamada streptomisin (300 μ g), gentamisin ve kanamisin (120 μ g) disklerinin kullanışlı olduğu gösterilmiştir. Sahm ve arkadaşları (12) *E. faecalis* suşlarında yüksek düzey aminoglikozid direncini belirlemede, 120 μ g gentamisin ve 300 μ g streptomisin içeren diskler kullanılarak yapılan disk difüzyon yönteminin uygun bir metod olduğunu tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada standart tarama sonuçlarıyla disk difüzyon yöntemi arasında tam bir uyum saptanmıştır (11). Aynı çalışmada disk difüzyon yönteminde 24 ve 48 saat inkübasyonlar arasında zon çaplarında önemli bir değişiklik ol-

madığı gösterilmiştir. Çalışmamızda 21 *E. faecium* izolatının 15 (% 71)'inde E-test ve disk difüzyon yöntemleriyle yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direnci saptanmıştır. Dokuz *E. faecalis* suşunun 3 (% 33)'ünde E-test ile yüksek düzey streptomisin direnci belirlenirken, disk difüzyon yöntemiyle bir suş dirençli, diğer iki suş orta duyarlı olarak tesbit edilmiştir. *E. faecalis* suşlarının 2 (% 22)'sinde E-test ile yüksek düzey gentamisin direnci bulunurken, disk difüzyon yöntemiyle birinin dirençli, diğerinin orta duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca disk difüzyon yöntemi ile yüksek düzey aminoglikozid direnci belirlenirken 24 ve 48 saat inkübasyon sonuçları karşılaştırıldığında direnç durumunda değişiklik olmadığı görülmüştür.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kriterlerinde 120 µg gentamisin ve 300 µg streptomisin içeren disklerle yapılan disk difüzyon yönteminde orta duyarlı bulunan enterokok suşlarının dilüsyon tarama testiyle incelenmesi gerektiği belirtilmektedir (9). Bu durumda enterokoklarda 120 µg gentamisin ve 300 µg streptomisin diski kullanılarak yapılan disk difüzyon yöntemiyle yüksek düzey aminoglikozid direnci araştırılıp, orta duyarlı olanlara dilüsyon tarama testi uygulanabilir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre hastanemizde vankomisine dirençli kan kültürü izolatı enterokok suşuna rastlanmamıştır. Bulgularımız, enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci saptanırken 120 µg gentamisin ve 300 µg streptomisin içeren diskler kullanılarak yapılan disk difüzyon yönteminin ucuz ve uygun bir yöntem olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Bartoloni A, Stefani S, Montella A, Leani S, Fonci R, Buanonimi MI, Pecile P: High-level aminoglycoside resistance and glycopeptide resistance among enterococci isolated from blood cultures, 1990-95, *Clin Microbiol Infect* 3: 385 (1997).
- 2- Frieden TR, Munsiff SS, Low DE, Willey BM, Williams G, Four Y, Eisner W, Warren S, Kreiswirth B: Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New-York city, *Lancet* 342: 76 (1993).
- 3- Gelişken S: Klinik örneklerden izole edilen enterokokların tiplendirilmesi, vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozid direncinin araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Kayseri (1996).
- 4- Granado FJ, Cisneros JM, Luque R, Torres-turtosa M, Gamboa F, Diez F, Villanueva JL, Cano RP, Pasquau J, Merino D, Menchero A, Mora D, Ruz MA, Vergara A: Comparative study of bacteremias caused by Enterococcus spp. with and without high-level resistance to gentamicin, *J Clin Microbiol* 36: 520 (1998).
- 5- Jones RN, Sader SH, Erwin ME, Anderson SC and the Enterococcus Study Group: Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates, *Diagn Microbiol Infect Dis* 21: 85 (1995).
- 6- Leclercq R, Malen SD, Nolen AB, Molinas C, Derlot E, Arthur M, Duval J, Courvalin P: Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides, *Clin Infect Dis* 14: 495 (1992).
- 7- Moellering RC: Enterococcus species, Streptococcus bovis, and Leuconostoc species, "GL Mandell, JE Bennet, R Dolin (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 4. baskı" kitabında s. 1826, Churchill Livingstone, New York (1995).
- 8- Murray BE: The life and times of the enterococcus, *Clin Microbiol Rev* 3: 46 (1990).
- 9- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 6th edition, Approved standard, NCCLS document M2-A6, NCCLS, Wayne Pa (1997).

- 10- Pesce A, Debbio EA, Toni M, Schito GC: Antibiotic resistance of clinical isolates of enterococcus in Italy, *Clin Infect Dis* 15: 494 (1992).
- 11- Sahm DF, Boonlayangoor S, Iwen PC, Baade JL, Woods GL: Factors influencing determination of high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*, *J Clin Microbiol* 29: 1934 (1991).
- 12- Sahm DF, Torres C: High-content aminoglycoside disks for determining aminoglycoside-penicillin synergy against *Enterococcus faecalis*, *J Clin Microbiol* 26: 257 (1988).
- 13- Torres C, Tenorio C, Lantero M, Zarazaga M, Baquero F: Detection of aminoglycoside-penicillin synergy against *Enterococcus faecium* using high-concent aminoglycoside disks, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14: 878 (1995).
- 14- Vural T, Şekercioğlu AO, Öğünç D, Gültekin M, Çolak D, Yeşilipek A, Kocagöz S, Ünal S, Mutlu G: Vankomisine dirençli *Enterococcus casseliflavus* suşu, *ANKEM Derg* 12:113 (1998).