

GLİKOPEPTİDLERE VE DENENDİĞİ BÜTÜN ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİ ENTEROCOCCUS FAECIUM SUŞU

Betigül ÖNGEN¹, Nezahat GÜRLER¹, Figen ESEN², Sabiha KARAYAY¹,
Kurtuluş TÖRECİ¹

ÖZET

Crush sendromu tanısıyla yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan 23 yaşındaki bir kadın hastanın santral venöz kateter örneğinden denendiği diğer antibiyotiklerle beraber vankomisin ve teikoplanine dirençli bir *Enterococcus faecium* suşu izole edilmiştir. Suşun MIC değerleri vankomisin için 512 µg/ml, teikoplanin için 32 µg/ml olarak saptanmış ve Van A geni taşıdığı belirlenmiştir. Çoklu antibiyotik direnci gösteren bakterinin beta-laktamaz oluşturmadığı ve gentamisine yüksek düzeyde dirençli olduğu görülmüştür.

SUMMARY

An Enterococcus faecium strain resistant to glycopeptides and all other antibiotics tested.

A vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain was isolated from the central venous catheter culture of an 23 years old, female, intensive-care unit patient with Crush syndrome. MIC values were 512 µg/ml for vancomycin and 32 µg/ml for teicoplanin and the strain had Van A gene. The strain was also found resistant to other antibiotics tested. It did not produce beta-lactamase and had high-level resistance to gentamicin.

GİRİŞ

Normal floranın fırsatçı patojenleri olarak tanınan enterokoklar bugün nozokomiyal infeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadırlar. Ancak son yıllarda enterokoklara gösterilen ilginin başlıca sebebi bu bakterilerin antibiyotiklere gittikçe artan direncidir (7,9). Enterokoklar birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmalarının yanında yeni direnç determinantları da kazanmaktadırlar. Uzun yıllardır enterokokların beta-laktamlara, aminoglikozitlere, linkosamidlere ve in-vivo trimetoprim-sulfametoksazole doğal olarak rölatif dirençli oldukları, aminoglikozitler, linkosamidler, makrolidler, tetrasiklin, kloramfenikol ve kinolonlara direnç kazanabildikleri ve ayrıca penisiline tolerans gösterdikleri bilinmektedir. Üreidopenisilinlerin tedavide yaygın olarak kullanılmasına rağmen endokardit gibi ciddi infeksiyonlarının tedavisinde penisilin ve aminoglikozit kombinasyonu tercih edilmektedir (9). Son yıllarda beta-laktamlara intrinsik dirençlerine ve penisiline toleran olmalarına ilaveten penisilin ve ampisilini inaktive edebilen beta-laktamaz oluşturan suşların ve ayrıca aminoglikozitlere yüksek düzeyde direnç gösteren suşların ortaya çıkmasıyla, elde en etkili silah olarak glikopeptid antibiyotikler kalmıştır (11). Ancak glikopeptid antibiyotiklerin de saltanatı fazla sürmemiş, 1987 yılında ilk vankomisine dirençli suş Av-

rupa'dan bildirilmiştir (12). Ülkemizde ise vankomisine direnci kesin olarak ispatlanmış ilk suş 1998 yılında Antalya'dan bildirilmiştir (13,14). Bu çalışmada da bir diğer suş bildirilecektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgu:

Crush sendromu tanısıyla 24.8.1999'da İstanbul Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji Anabilim Dalı Yoğun Bakım Ünitesine sevk edilen 23 yaşındaki kadın hastaya entübasyon ve mekanik ventilasyon uygulanmıştır. Hastaya sefazol, metronidazol başlanıp 8. güne kadar devam edilmiş ve idrar çıkışı olmadığından hemofiltrasyon başlanmıştır. Servise yatışının 3. gününde kan kültüründen *Pseudomonas* spp. üremesi üzerine 10. gün siprofloksasin ve amikasin başlanmış, idrar çıkışı da yeterli düzeye ulaşınca hasta 7.9.1999'da taburcu edilmiştir. Hasta 10.9.1999'da septik tablo ile tekrar gelmiş, kan kültüründe *Pseudomonas* spp. ve MRSA üremesi üzerine seftazidim ve vankomisin başlanıp dört gün sonra amikasin eklenmiş ve bu tedaviye 21 gün devam edilmiştir. Bu arada gönderilen santral venöz kateter örneğinden yapılan semikantitatif kültürde *K. pneumoniae* (100 koloni), *Pseudomonas* spp. (50 koloni), enterokok (50 koloni) ve MSKNS (20 koloni) üremesi saptanıp, enterokokun vankomisine dirençli olduğu belirlenmiştir. Yüksek ateş, batın distansiyonu, hemogloblin düşüklüğü nedeniyle opere edilerek batından hemorajik sıvı boşaltılan, lökosit sayısı 20,000 olan ve inotropik destek ihtiyacı devam eden hasta 5.10.1999'da eksitus olmuştur.

Vankomisine dirençli enterokokun izolasyon ve identifikasyonu:

Kateter ucunun bütün yüzeyinin besiyerine sürülüp öze ile yayılması ile yapılan semikantitatif kültürde başka üç bakteri ile beraber kanlı jeloz besiyerinde 50 koloni kadar üreyen alfa hemolizli kolonilerden saf kültür alınmış ve Gram morfolojisi, katalaz, hemoliz, eskülin hidrolizi, % 6.5 NaCl'lü buyyonda üreme ve PYR özellikleri incelenerek ve ayrıca, API 20 Strep (bioMérieux) ve Sceptor *Streptococcus* MIC/ID (Becton Dickinson) kitleri ile *Enterococcus faecium* olarak identifiye edilmiştir (2). Suşun antibiyotiklere duyarlılık deneyleri NCCLS standartlarına uygun olarak disk difüzyon yöntemi ile yapılmış, bazı antibiyotiklerin MIC değerleri E-test ile, vankomisin ve teikoplanin için MIC değeri agar dilüsyon, makrodilüsyon, E-test yöntemleri ve Sceptor *Streptococcus* MIC-ID paneli kullanılarak belirlenmiş, bu iki glikopeptid için deneyler her defasında farklı kaynaktan temin edilen antibiyotik hammaddesi ve E-test stripleri kullanılarak iki kez daha tekrarlanmıştır (10). Suşun vankomisin direnci saptandığında ilk izolasyon besiyerinden 3 koloni daha alınmış ve hepsinin vankomisine dirençli olduğu görülmüştür. Beta-laktamaz varlığı nitro-sefin diski (BBL) ile ve yüksek düzeyde gentamisin direnci 120 µg'lık gentamisin diski (Mast Diagnostics) ile araştırılmıştır. Deneylerde kontrol suşları olarak *E. faecalis* ATCC 29212 ve *S. aureus* ATCC 25923 kullanılmıştır. Vankomisin ve teikoplanine direnç saptanınca suş gen düzeyinde incelenmek üzere Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesine gönderilmiştir.

BULGULAR

Kateter kültüründe kanlı jeloz besiyerinde üreyen alfa hemolizli bakteriler klasik mikrobiyolojik yöntemlerle Gram pozitif zincir yapmış kok şeklindeki morfolojileri, katalaz negatifliği, eskülini hidrolize etmeleri, % 6.5 NaCl'lü buyyonda üremeleri ve PYR pozitiflikleri ile enterokok olarak, API 20 Strep Sceptor *Streptococcus* MIC/ID kitleri ile *Entero-*

coccus faecium olarak tanımlanmıştır. Suşun beta-laktamaz oluşturmadığı saptanmıştır.

Disk difüzyon deneyi ile suşun denendiği tüm antibiyotiklere (tabloda) dirençli olduğu ve ayrıca yüksek düzeyde gentamisin direnci bulunduğu saptanmıştır. Bütün tekrarlarında vankomisin için MIC 512 µg/ml, teikoplanin için MIC 32 µg/ml olarak belirlenmiş, glikopeptid ve diğer bazı antibiyotikler için saptanan MIC değerleri tabloda gösterilmiştir. Sonuçlar suşun bu antibiyotiklerin de tümüne dirençli olduğunu göstermiştir.

Direnç geni varlığı açısından PCR yöntemi ile yapılan incelemede suşun Van A geni taşıdığı saptanmıştır.

Tablo . E. faecium suşunun glikopeptid ve diğer bazı antibiyotikler için elde edilen MIC değerleri ve disk difüzyon deneyleri sonuçları.

Antibiyotik	Sonuç (MIC, µg/ml)	Yöntem
Vankomisin	>256 512 512 >32	E-test Agar dilüsyon Makrodilüsyon Sceptor
Teikoplanin	32 32 32	E-test Agar dilüsyon Makrodilüsyon
Penisilin G	>32	E-test
Klindamisin	>256	"
Ofloksasin	>32	"
Siprofloksasin	>32	"
Trovafloksasin	>4	"
Levofloksasin	>32	"
Gentamisin	>1024	"
Amikasin	>256	"
Vankomisin, teikoplanin, penisilin, ampisilin, ampisilin+sulbaktam, amoksisilin+klavulanik asit, imipenem, meropenem, rifampin, gentamisin, netilmisin, amikasin, tobramisin, eritromisin, klindamisin, ofloksasin, siprofloksasin	Dirençli*	Disk difüzyon

* Teikoplanin ve amoksisilin+klavulanik asitle 10 mm inhibisyon zonu alınmış, diğerlerinde disk etrafında inhibisyon zonu görülmemiştir.

İzole ettiğimiz suş için vankomisin ve teikoplanin MIC değerleri Doç Dr H. Vahaboğlu (Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi) tarafından da 512 µg/ml ve 32 µg/ml olarak saptanmıştır.

TARTIŞMA

Vankomisine dirençli ilk enterokok suşunun Avrupa'dan bildirilmesine rağmen glikopeptid dirençli enterokoklar ABD'de daha yüksek oranda görülür olmuştur (4). 1989'dan 1997'ye kadar geçen sürede Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) ve Ulusal Nozokomiyal Sürveyans Sistemine (NNIS) bildirilen vankomisine dirençli enterokoklara (VRE) bağlı infeksiyonların oranı % 0.3'den % 15.4'e çıkmış, bu oran yoğun bakım ünitelerinde 58 kat artışla % 0.4'den 23.2'ye ulaşmıştır (8).

VRE epidemiyolojisi tam olarak belirlenmemişse de, uzun süre hastanede yatan, kateter ve cerrahi girişim uygulanan, çoklu antibiyotik ve/veya vankomisin tedavisi altında olan yoğun bakım hastaları, onkoloji veya transplantasyon hastaları gibi alta yatan ciddi bir hastalığı veya immunosupresyonu olan hastaların VRE infeksiyonu açısından daha fazla risk altında oldukları bildirilmektedir (6). Ayrıca metronidazol kullanımının da büyük bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (1). VRE izole ettiğimiz hasta da bu kriterlerin çoğuna sahip görünmektedir.

Türkiye'de sevindirici bir şekilde son bir yıla kadar enterokoklar glikopeptid antibiyotiklere duyarlı bildirilirken, detaylı olarak incelenmiş ve sonuçları farklı laboratuvarlarda da değerlendirilip doğrulanmış ve direnç geninin de saptandığı ilk suş Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden 1998'de bildirilmiştir (13,14). Vankomisin için MIC'i 256 µg/ml olan, Van A geni taşıyan ve önce *E. casseliflavus* olarak bildirilen bu suş daha sonra *E. faecium* olarak tanımlanmıştır, bir ülkede ilk kez bildirilen bir suş için sonuçların doğrulanmasının gerekliliğini göstermesi açısından iyi bir örnek oluşturmaktadır. İzole ettiğimiz suş Antalya'da izole edilen suşa benzer şekilde çoklu direnç ve yüksek düzeyde gentamisin direnci göstermektedir. Ancak bu iki suşun karşılaştırılması amacıyla yapılan AP-PCR farklı klonlar olduklarını göstermiştir.

Hastanemizden izole ettiğimiz suşun glikopeptid direnci agar dilüsyon, makrodilüsyon, E-test yöntemleri ve Sceptor paneli kullanılarak saptanmış ve bu dört ayrı yöntemle birbirini destekleyen sonuçlar alınmıştır. Dirençli subpopulasyonları saptayamadığı bildirildiğinden mikrodilüsyon yöntemi kullanılmamıştır (5). Suşun glikopeptidler için MIC değerleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde de doğrulanmıştır ve Van A geni taşıdığı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi laboratuvarında belirlenmiştir.

Çeşitli ülkelerden bugüne kadar bildirilen VRE salgınlarının çoğu Van A fenotipi ile ortaya çıkmıştır. Yüksek düzeyde, indüklenebilen ve aktarılabilen Van A direnci genellikle plazmit kaynaklıdır. Fakat bugün bir transpozonda kodlandığı ve kromozoma geçebileceği bilinmektedir (3). Her ne kadar 1996'dan itibaren bildirilmeye başlanan vankomisin duyarlılığı azalmış *S. aureus* suşları enterokoklardan direnç genlerinin aktarımı ile oluşmamışsa da, gelecekte bu direncin yayılması korkusu hâlâ mevcuttur (3,11). İzole ettiğimiz suşta ve Antalya'dan bildirilen suşta direnç Van A tipi dirençtir.

Glikopeptid antibiyotiklere dirençli enterokok infeksiyonlarının tedavisinde yeni ve etkili antibiyotik bulma çalışmaları devam etse de, sonuçta görünen klinik kullanıma uygun bilinen tüm antibiyotiklere dirençli enterokoklarla karşı karşıya kalındığıdır (3). Bu nedenle izole edilen enterokokların glikopeptid antibiyotiklere direnci dikkatle incelenmeli ve izlenmelidir.

*Teşekkür: Suşun direnç genini ve AP-PCR ile incelenmesini sağlayan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına, MIC değerlerimizi doğrulayan Doç Dr Vahaboğlu (Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi)'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1- Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, Pfaller MA, Hwang T, Sanford MD, Wenzel RP: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* bacteremia: Risk factors for infection, *Clin Infect Dis* 20:1126 (1995).
- 2- Faclam RR, Sahm DF: Enterococcus, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA; Tenover FC, Tenover RH (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s. 308, Am Soc Microbiol, Washington (1995).
- 3- French GL: Enterococci and vancomycin resistance, *Clin Infect Dis* 27 (Suppl):S75 (1998).
- 4- Goossens H: Spread of vancomycin-resistant enterococci: Differences between the United States and Europe, *Infect Control Hosp Epidemiol* 19:546 (1998).
- 5- Hindler J: Antimicrobial susceptibility testing; Broth microdilution MIC test, "Isenberg HD (ed): *Essential Procedures for Clinical Microbiology*" kitabında s. 216, Am Soc Microbiol, Washington (1998).
- 6- Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC): Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance, *Infect Control Hosp Epidemiol* 16:105 (1995).
- 7- Leclercq R, Courvalin P: Emerging problems with enterococcal infections, *Curr Opin Infect Dis* 9:115 (1996).
- 8- Martone JW: Spread of vancomycin-resistant enterococci: Why did it happen in the United States?, *Infect Control Hosp Epidemiol* 19:539 (1998).
- 9- Moellering RC Jr: The enterococcus: A classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options, *J Antimicrob Chemother* 28:1 (1991).
- 10- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Eighth Informational Supplement, M100-S8, NCCLS, Wayne (1998).
- 11- Töreci K: Glikopeptid antibiyotikler: Dünü, *ANKEM Derg* 13:272 (1999).
- 12- Uttley AHC, George RC, Naidoo J, Woodford N, Johnson AP, Collins CH, Morrison D, Gilfillan AJ, Fitch LE, Heptonstall J: High-level vancomycin resistant enterococci causing hospital infections, *Epidemiol Infect* 103:173 (1989).
- 13- Vural T, Şekerciöğlü AS, Öğünç D, Gültekin M, Çolak D, Yeşilipek A, Ünal S, Kocagöz S, Mutlu G: Vankomisine dirençli *Enterococcus casseliflavus* suşu, *ANKEM Derg* 12:113 (1998).
- 14- Vural T, Şekerciöğlü AS, Öğünç D, Gültekin M, Çolak D, Yeşilipek A, Ünal S, Kocagöz S, Mutlu G: Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu, *ANKEM Derg* 13:1 (1999).