

MERAM TIP FAKÜLTESİ HASTANESİNDE İZOLE EDİLEN İLK GLİKOPEPTİD DİRENÇLİ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* SUŞU*

İnci TUNCER¹, Belgin ALTUN², İsmail REİSLİ³, Yavuz KÖKSAL³,
Meral KAYA¹, Uğur ARSLAN¹

ÖZET

Pediatric kliniğine pnömoni ve sepsis ön tanısı ile yatırılan 5.5 aylık erkek bebeğin kan kültüründen *Enterococcus faecium* suşu izole edilmiştir. Laboratuvarımızda izole ettiğimiz *E. faecium* suşunun identifikasyonu klasik bakteriyolojik yöntem ve API 20 Strep (BioMerieux-France) otomatize sistemi ile yapılmıştır. Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyogramda vankomisin, teikoplanin, penisilin, ampicilin, ampicilin/sulbaktam, eritromisin, gentamisin, imipenem, streptomisin dirençli ve tetrasiklin, kloramfenikol, levofloksasin siprofloksasine duyarlı sonuç alınmıştır. E test ile MİK değerleri; ampicilin 256 µg/ml, teikoplanin 64 µg/ml, vankomisin 128 µg/ml, imipenem 32 µg/ml, gentamisin >512 µg/ml ve streptomisin 2000 µg/ml MİK olarak belirlenmiştir. İzole edilen suşun PCR yöntemi ile *VanA* direnç geni taşıdığı belirlenmiştir. Glikopeptid dirençli bu enterokok suşunun aynı zamanda çoklu antibiyotik direnci gösterdiği ve beta-laktamaz oluşturmadığı gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Enterococcus faecium*, glikopeptid direnci

SUMMARY

First glycopeptid resistant Enterococcus faecium strain isolated in the Hospital of Meram Faculty of Medicine.

An *Enterococcus faecium* strain was isolated from the blood culture of a 5.5 months old boy with pneumonia and sepsis in pediatrics clinic. *E. faecium* was identified by classical bacteriological methods and API 20 Strep (BioMerieux-France) automatized system. The antibiotic susceptibility of the isolate was determined by Kirby-Bauer disk diffusion method. The isolate was resistant to vancomycin, teicoplanin, penicillin, ampicillin, ampicillin/sulbactam, erythromycin, gentamicin, imipenem, streptomycin and susceptible to tetracycline, chloramphenicol, levofloxacin and ciprofloxacin. MICs were determined by E-test, and the results were found as; ampicillin 256 µg/ml, teicoplanin 64 µg/ml, vancomycin 128 µg/ml, imipenem 32 µg/ml, gentamicin >512 µg/ml and streptomycin 2000 µg/ml.

VanA resistance gene was identified by PCR in the isolate. This glycopeptid resistant *Enterococcus* isolate was determined as a multiple resistant and had no beta-lactamase activity.

Key words: *Enterococcus faecalis*, glycopeptid resistance

GİRİŞ

Enterococcus faecium insanların normal barsak florasında bulunmasına rağmen bakteriyel endokardit, bakteremi, yara enfeksiyonu, üriner sistem enfeksiyonu ve intraabdominal enfeksiyonların önemli patojenidir (20,21). Enterokoklar virulansı düşük mikroorganizmalardır ancak son yıllarda nozokomiyal enfeksiyonlarda en sık rastlanan patojen haline

gelmiştir. Enterokok enfeksiyonlarında üçüncü sırayı bakteremiler almakta ve ölüm oranı % 31-37'yi bulmaktadır (2,6,11).

Son yıllarda yapılan çalışmalar çoğul dirençli suşların sayısının gittikçe arttığını göstermiştir (2,6). Beta-laktam antibiyotiklere doğal dirençli olmaları, penisiline toleran ve

* 18. ANKEM Klinikler ve Tıp Bilimleri Kongresi'nde sunulmuştur (25-29 Mayıs 2003, Antalya).

1- Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

2- Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara.

3- Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya.

ayrıca aminoglikozidlere yüksek düzeyde direnç gösteren enterokokların ortaya çıkması ile en etkili silah olarak glikopeptid antibiyotikler kullanılmaya başlanmıştır. Ancak 1980'li yılların sonlarına doğru Avrupa'da vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşları bildirilmesine karşılık ABD'de sporadik olarak gözlenen VRE suşları daha sonra ortaya çıkmıştır. Yakın tarihte ABD'de dirençli suş sayısında daha hızlı artış olmuştur (9,10). Son yıllarda ülkemizde de

çeşitli merkezlerde vankomisine dirençli enterokoklar bildirilmeye başlamıştır (1,2,4,14,19,23). Kan kültüründen izole ettiğimiz *Enterococcus faecium*, glikopeptid antibiyotiklere dirençli hastanemizde izole edilen ilk suştur. Hastanemizde de epidemiyolojik yönden önemli bir tehlikenin yanı sıra başımızda olabileceğinin göstergesi olan bu izolat nedeniyle konunun önemini tekrar gündeme getirmek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgu: 3 Nisan 2002 tarihinde 5.5 aylık erkek bebek sepsis ve pnömoni ön tanısı ile çocuk kliniğine yatırılmıştır. Fizik muayenesinde genel durumu kötü, takipneli, interkostal çekilmeleri olan hastanın, solunum sistemi muayenesinde bilateral raller mevcut olup, rutin laboratuvar tetkikleri ile birlikte kan kültürü hasta başında alınarak laboratuvara gönderilmiştir. Hastaya vankomisin ve seftriakson tedavisine başlanmış, on beş gün sonunda semptomları düzelmeyen ve ateşi düşmeyen hastanın tedavi şeması değiştirilerek imipenem başlanmıştır. İmipenem tedavisine de yanıt alınamayan hastanın 3 Mayıs 2002 tarihinde kan kültürü tekrarlanmıştır. Genel durumu bozuk olan hasta bir hafta sonra eksitus olmuştur.

Glikopeptid dirençli *Enterococcus faecium* suşunun izolasyon ve identifikasyonu: İlk yapılan kan kültüründe üreme olmamıştır. Hastadan alınan ikinci kan örneğinin BACTEC 9050 kan kültür sisteminde üreme sinyali alındıktan sonra (3 Mayıs 2002'de saat 14.25'de kan kültürü alınmış, 4 Mayıs 2002 saat 7.00'de üreme sinyali vermiştir) % 5 koyun kanlı agar ve EMB agara pasajı yapılmıştır. Üreyen kolonilerin morfoloji, hemoliz özelliği, Gram boyama, katalaz testi, klasik yöntemler ve API 20 Strep (BioMerieux-France) otomatize sistemi ile türü belirlenmiştir. Suşun NCCLS kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyogramı ve E-test yöntemi ile MİK değerleri belirlenmiştir (13). Beta-laktamaz varlığı nitrosefin diski (BBL Becton Dickinson) ile araştırılmıştır.

Kalite kontrol için *E.faecalis* ATCC 29212 ve *S.aureus* ATCC 25923 suşları kullanılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile direnç tayini: PCR ile *VanA* tipi direnç geninin varlığı araştırılmıştır. *E.faecium* suşundan DNA ekstraksiyonu için bir gece Mueller-Hinton buyyon besiyerinde üretildikten sonra 10 dak. 3000 rpm'de santrifüje edilmiştir. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet 1 ml TE tampon ile (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA,

pH: 7.5) süspanse edilerek Eppendorf tüpe aktarılmış ve 10,000 rpm'de 10 dak. santrifüje edilmiştir. Üst sıvı tekrar dökülerek 4-100 µg/ml'lik lizostafinden 50 µl eklenip, vorteksledikten sonra 10 dak. 37°C'lik sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Üzerine 100 µg/ml proteinaz K'dan 50 µl eklenip tekrar vortekslenmiş, sonra 10 dak. 37°C'lik sıcak su banyosunda tutulmuş, daha sonra da kaynayan suda 15 dak. kaynatılmıştır. Kaynadıktan sonra 10 dak. mikrosantrifüjde çevirip, üst sıvı pelete dokunmadan alınmış ve hazırlanan DNA kullanılıncaya kadar -20°C'de bekletilmiştir.

VanA tipi direnç geninin varlığı için 10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM deoksinükleozid trifosfatlar, 20 nM *VanA1* primeri (5' ATG AAT AGA ATA AAA GTT GCA ATA C 3') ve *VanA2* primeri (5' CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT 3'), 1 U Taq polimeraz ve 5 µl DNA içeren toplam 50 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Thermal Cycler ısı döngüleri şu şekilde ayarlanmıştır:

94°C 5 dakika	30 siklus
94°C 30 saniye	
58°C 30 saniye	
72°C 30 saniye	
72°C 10 dakika	

Elde edilen amplifikasyon ürünleri % 1'lik agarozaya yüklenerek 100 V'da 30 dak. elektroforez ile analiz edilmişlerdir. Amplifikasyon ürünü 1029 bp'de ürün görülmesi *VanA* geni için pozitif olarak değerlendirilmiştir (15,22).

Çevre kontrolü: VRE saptanan hastamız kan kültür alınımından bir hafta sonra eksitus olduğu için kontrol kültürleri yapılamamıştır. Suşun kaynağını belirlemek amacı ile olgunun yattığı kliniğin personelinin rektal sürüntü ve ayrıca hasta odalarındaki eşya ve tıbbi cihazlardan kültür alınarak VRE yönünden araştırılmıştır.

BULGULAR

Kan kültürünün koyun kanlı agardaki pasajında üreyen alfa hemolizli kolonilerin, Gram pozitif zincir yapmış kok şeklinde morfolojileri, katalaz ve optokin deneylerinin nega-

tif olması, % 6.5 NaCl bulunan buyyonda üremeleri ve ayrıca API 20 Strep kiti ile çalışma sonucu *Enterococcus faecium* olduğu belirlenmiştir. Bu suşun beta-laktamaz oluşturma-

dığı gözlenmiştir.

Klinikte yapılan çevre kontrol kültürlerinde VRE suşu üretilmemiştir.

Disk difüzyon yönteminde vankomisin, teikoplanin, penisilin, ampisilin, ampisilin/sulbaktam, eritromisin, imipenem, gentamisin ve streptomisine dirençli sonuç elde edilirken, tetrasiklin, kloramfenikol, levofloksasin ve siprofloksasine duyarlı sonuç elde edilmiştir.

TARTIŞMA

Enterokoklarda glikopeptid direnci, sadece vankomisine direnç olması veya hem vankomisine ve hem de teikoplanine direnç olması, direncin indüklenebilir olup olmaması ve diğer bakterilere geçirilip geçirilmemesine göre gruplandırılır. *VanA* geni içeren bakteriler hem vankomisin hem de teikoplanine dirençlidir. *VanB* ve *VanC* geni taşıyan enterokoklar ise vankomisine dirençli, teikoplanine duyarlıdır. VRE suşlarındaki direncin plazmid ve transpozon (Tn1546) aracılığı ile kazanılmış olması, direncin aktarılabilir olması, diğer Gram pozitif bakteriler arasında yayılabileceğini göstermektedir (17,18). Enterokokların tedavide sık kullanılan aminoglikozid ve beta-laktam antibiyotiklere doğal olarak dirençli olmaları nedeni ile uzun yıllar tek seçenek olarak vankomisinin kullanılması dirençli suşların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Glikopeptid antibiyotikler ile diğerleri arasında çapraz direnç olmamasına rağmen, VRE suşlarında sıklıkla çoğul dirence rastlanmaktadır (2).

Hastane kaynaklı infeksiyonlarda, glikopeptidlere dirençli suşların sayısı gittikçe artmaktadır. Özellikle ampirik tedavi ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı dirençli enterokokların kolonizasyonunu artırmaktadır. NNISS (National Nosocomial Infection Surveillance System) verilerine göre klinik izolatlardan izole edilen VRE suşlarının oranı önceleri % 0.3 iken daha sonraki yıllarda % 7.9'a yükselmiştir (20). Vankomisine dirençli *E.faecium*'un neden olduğu hastane kaynaklı salgınlarda penisiline ve gentamisine de dirençli yüksek olduğu gösterilmiştir (9).

Ülkemizde ilk vankomisine dirençli enterokok suşu Akdeniz Üniversitesinden bildirilmiştir (19). Daha sonra glikopeptid antibiyotiklere dirençli enterokoklar değişik merkezlerden bildirilmeye başlamış ve çeşitli klinik örneklerden izole edilen bu enterokok suşlarının *E.faecium* olarak belirlendiği, hepsinin de *VanA* direnç geni taşıdığı saptanmıştır (1,2,4,14).

Laboratuvarımızda izole ettiğimiz suşun glikopeptid direnci önce disk difüzyon ile saptanmıştır. Daha sonra E-test yöntemi ile MİK değerleri belirlenmiş ve disk difüzyon yöntemini destekleyen sonuçlar alınmıştır. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi Laboratuvarı'nda suşun MİK değerleri doğrulanmış ve *VanA* direnç geni taşıdığı gösterilmiştir. Ayrıca klinikte yapılan çevre kontrol kültürlerinde VRE üretilmemesi bu suşun endojen kaynaklı olduğunu düşündürmüştür. Bu sonuçlar bize göstermektedir

E test ile MİK değerleri; teikoplanin 64 µg/ml, vankomisin 128 µg/ml, imipenem 32 µg/ml, ampisilin 256 µg/ml, gentamisin >512 µg/ml ve streptomisin 2000 µg/ml olarak saptanmıştır.

PCR yönteminde *VanA1* ve *VanA2* primerleri ile 1029 baz çiftinde bant görülmesi pozitif sonucu göstermiştir. Böylece bu suşun *VanA* geni taşıyan *E.faecium* olduğu doğrulanmıştır.

ki hastanemizde de epidemiyolojik açıdan çok önemli bir tehlike ile karşı karşıyayız. Hastanemiz kliniklerinde uygulanan antibiyotik tedavi şemasını irdeleyecek olursak: 1- Hastanemizde hemodiyaliz ünitesi olgularında, kateter infeksiyonu düşünüldüğünde rutin olarak vankomisin tedavisi uygulanmakta, 2- Periton diyalizi sırasında infeksiyon bulguları görüldüğünde tek doz rutin vankomisin verilmekte, 3- Diğer kliniklerde stafilokok infeksiyonlarında vankomisin ilk seçenek olarak kullanılmakta, 4- Hayatı tehdit etmeyen MRSA infeksiyonlarının tedavisinde vankomisin rutin verilmektedir. İşte hastanemiz kliniklerinin bu antibiyotik uygulama stratejisi VRE suşlarının oluşması ve sayısının artmasına neden olabilir. Ülkemizde birçok merkezde VRE suşlarının izole edilmesi ve bildirilmesi bazı ciddi önlemlerin alınması açısından önemlidir. Konunun tekrar tekrar gündeme getirilmesinin bu yanlış uygulamalar için uyarıcı olacağı kanısındayız.

Bir aminoglikozid grubu antibiyotikle hücre duvarına etkili olan antibiyotiğin kombinasyonu enterokoklara in-vivo ve in-vitro koşullarda bakterisit etkilidir. Ancak enterokokların ampisilin ve vankomisine direnç geliştirmesi ile birlikte yüksek düzey aminoglikozid direncinin görülmesi bu mikroorganizmaya karşı antibiyotik tedavisini komplike hale getirmiştir (12).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda vankomisin ve ampisiline dirençli *E.faecium* izolatlarının linezolid ve kinupristin-dalfopristine duyarlı olduğu bildirilmektedir (3,7,8). Kinupristin-dalfopristin iki intravenöz kullanılan streptogramin grubu antibiyotiğin kombinasyonudur. Preparatın hayvan modeli çalışmalarında BOS'a geçişinin az olduğu ifade edilmektedir (16). Buna karşılık Garey ve ark. (8) BOS'dan izole ettikleri vankomisine dirençli *E.faecium* infeksiyonlarının tedavisi için intravenöz kinupristin-dalfopristin kullanmışlar ve 11 gün sonra steril BOS kültürü elde etmişlerdir. Linezolid ise oksazolidon grubu antibiyotiklerin bir üyesidir. Vankomisine dirençli *E.faecium*'a linezolid bakteriyostatik etki göstermekle birlikte diğer streptokoklara bakterisit etki gösterir (3). Babcock ve ark. (3) *E.faecium*'a bağlı endokarditli bir hasta da oral linezolidi başarı ile kullanmışlardır. Ancak bu antibiyotikler henüz ülkemizde kullanıma sunulmamıştır.

Mikroorganizmalar hedef antibiyotiklere direnç geliştirdikçe insanoğlu yeni arayışlarını sürdürmeye devam etmektedir. Ancak dirençli suşların yaptığı infeksiyonda bu alternatif ilaçların ne kadar süre ile etkili olacağı hakkında fikir yürütmek oldukça zordur.

KAYNAKLAR

- 1- Akıncı E, Kılıç H, Karabiber N et al: İki hastanın kan kültüründen izole edilen vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşları, *Flora* 7:126 (2002).
- 2- Aydoğan H, Beşirbellioğlu B, Alaca R, Başustaoğlu A, Dizer U, Özyurt M: GATA'da izole edilen ikinci glikopeptid dirençli *Enterococcus faecium*, *Gülhane Tıp Derg* 44:82 (2002).
- 3- Babcock HM, Ritchie DJ, Christiansen E, Starlin R, Little R, Stanley S: Successful treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus endocarditis* with oral linezolid, *Clin Infect Dis* 32:1373 (2001).
- 4- Başustaoğlu A, Özyurt M, Beyan C et al: Kan kültüründen izole edilen glikopeptid dirençli *Enterococcus faecium*, *Flora* 5:142 (2000).
- 5- Çetinkaya Y: Vankomisin dirençli enterokoklar: Epidemiyoloji ve kontrol, *Flora* 5:24 (2000).
- 6- Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG: Vancomycin-resistant enterococci, *Clin Microbiol Rev* 13:686 (2000).
- 7- Eliopoulos GM, Wennersten CB: Antimicrobial of quinupristin-dalfopristin combined with other antibiotics against vancomycin-resistant enterococci, *Antimicrob Agents Chemother* 46:1319 (2002).
- 8- Garey KW, Tesoro E, Muggia V, Pasquier O, Rodvold KA: Cerebrospinal fluid concentrations of quinupristin-dalfopristin in a patient with vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* ventriculitis, *Pharmacother* 21:748 (2001).
- 9- Handwerger S, Raucher B, Altarac D et al: Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin and gentamicin, *Clin Infect Dis* 16:750 (1993).
- 10- Iversen A, Kühn I, Franklin A, Möllby R: High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage, *Appl Environ Microbiol* 68:2838 (2002).
- 11- Moellering RC: *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R(eds): *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5. baskı" kitabında s. 2147, Churchill Livingstone, Philadelphia (2000).
- 12- Murray PR, Bracher JL, Niles AC, Hampton CM: In vitro activity of nine fluoroquinolone antibiotics against 200 strains of enterococci, *Diagn Microbiol Infect Dis* 16:83 (1993).
- 13- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*: Eight Informational Supplement, NCCLS Document M100-S8, Wayne (1998).
- 14- Öngen B, Gürler N, Esen F, Karayay S, Töreci K: Glikopeptidlere ve denendiği bütün antibiyotiklere dirençli *Enterococcus faecium* suşu, *ANKEM Derg* 13:501 (1999).
- 15- Perlada DE, Smulian AG, Cushion MT: Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of enterococci in Cincinnati, Ohio: A prospective citywide survey, *J Clin Microbiol* 35:2342 (1997).
- 16- Tarasi A, Dever LL, Tomasz A: Activity of quinupristin-dalfopristin against *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo in the rabbit model of experimental meningitis, *J Antimicrob Chemother* 39 (Suppl A):121 (1997).
- 17- Töreci K: Glikopeptid antibiyotikler: Dünyü, *ANKEM Derg* 13:272 (1999).
- 18- Ünal S: Glikopeptid antibiyotikler: Bugünü ve yarını, *ANKEM Derg* 13:278 (1999).
- 19- Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D et al: Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu, *ANKEM Derg* 13:1 (1999).
- 20- Weinstein J, Roe M, Towns M et al: Resistant enterococci: A prospective study of prevalence, incidence and factors associated with colonization in a university hospital, *Infect Control Hosp Epidemiol* 17:36 (1996).
- 21- Willey BM, Kreiswirth BN, Simor AE et al: Detection of vancomycin resistance in *Enterococcus* species, *J Clin Microbiol* 30:1621 (1992).
- 22- Woodford N, Stigter JM: Molecular investigation of glycopeptide resistance in Gram positive bacteria, "Woodford N, Johnson AP (eds): *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*" kitabında s. 579, Humana Pres, Totawa, New Jersey (1998).
- 23- Yüce A, Karaman M, Gülay Z, Yuluğ N: Vancomycin-resistant enterococci in neonates, *Scand J Infect Dis* 33:803 (2001).