

Enterokoklarda Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci ile Beta Laktamaz Üretimi İlişkisi(*)

Halil YAZGI(**), Mustafa ERTEK(***), Hakan USLU(**), Ayten KADANALI(***)

(*)XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (30 Eylül-5 Ekim 2002) sunulmuştur.

(**)Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum

(***)Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum

ÖZET

Enterokoklarda beta laktamlara olan direnç penisilin bağlayan proteinlerdeki değişikliklerin yanında beta laktamaz üretimi-ne de bağlı olabilir. Beta laktamaz üretimi penisilinlerle aminoglikozidler arasındaki sinerjistik etkinin kaybolmasına neden olur. Enterokoklardaki penisilinaz aktivitesinin yüksek düzey gentamisin direncine de neden olan bir plazmid üzerinde taşındığı saptanmıştır. Çalışmamızın amacı enterokoklarda beta laktamaz üretimini araştırmak ve yüksek düzey aminoglikozid direnci ile beta laktamaz üretimi arasında ilişki olup olmadığını değerlendirmektir. Bu amaçla Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanelerinde yatmakta olan 163 hastanın rektal sürüntü örnekleri alınmıştır. İzole edilen suşların safralı-eskülinli besiyerinde ve %6.5 NaCl'li besiyerinde üreme, koyun kanlı agar'da hemoliz, katalaz, Gram boyama ve API 20 Strep (Bio-Merieux-France) testleri ile cins ve tür düzeyinde tanıları yapılmıştır. Yüksek düzey aminoglikozid direnci standart agar tarama yöntemiyle araştırılmıştır. Beta laktamaz üretiminin araştırılmasında "Identification sticks b -lactamase (Nitrocefim) (Oxoid)" kullanılmıştır. 163 rektal sürüntü örneğinin 116'sından enterokok suşu izole edilmiştir. Bu suşların 67'si *E. faecalis*, 45'i *E. faecium*, üçü *E. casseliflavus* ve biri *E. avium* olarak tanımlanmıştır. Yüksek düzey aminoglikozid direnci gentamisin için % 25.9, streptomisin için %34.5 bulunmuştur. Yüksek düzey aminoglikozid direnci gösteren ve göstermeyen enterokok türlerinde beta laktamaz üreten suşa rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Enterokok, yüksek düzey aminoglikozid direnci, beta laktamaz

SUMMARY

The Relationship between Beta Lactamase Production and High Level Aminoglycoside Resistance in Enterococci

The resistance to beta-lactams in enterococci may be related to not only the changes in penicillin-binding proteins but also the production of beta-lactamase. The production of beta-lactamase may lead to the loss of synergistic effect between penicillins and aminoglycosides. It was detected that the penicillinase activity of the enterococci has been carried out by a plasmid which has responsible for the high level aminoglycoside resistance. It was detected that the penicillinase activity of the enterococci has been carried out by a plasmid which was responsible for the high level gentamicin resistance (HLAR). The aim of our study was to investigate the production of beta-lactamase in enterococci and the relationship of high level aminoglycoside resistance with beta-lactamase production. For this purpose 163 rectal swabs of patients from Atatürk University Research Hospital were included in this study. Genus and species determination of the bacteria was done by traditional methods and API 20 Strep commercial test. HLAR was investigated by standard agar screening method. Nitrocephin identification stick was used in the investigation of beta-lactamase production. Enterococci were isolated in 116 of 163 rectal swabs. Of these strains, 67 were identified as *Enterococcus faecalis*, 45 as *Enterococcus faecium*, three as *Enterococcus casseliflavus* and one was *Enterococcus avium*. HLAR was found in 25.9% of the strains for gentamicin and in 34.5% of the strains for streptomycin. Beta-lactamase producing enterococci strain was not detected in strains with or without HLAR.

Key words: Enterococci, high level aminoglycoside resistance (HLAR), beta lactamase

GİRİŞ

Enterokoklar, virülansı düşük düzeyde olmalarına karşın önemli nozokomiyal patojenler olarak önem

kazanmışlardır. Birçok merkezde nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarından üçüncü ve üriner sistem enfeksiyonlarından ikinci en sık izole edilen patojenlerdir. Bunun yanı sıra enterokoklar antimikrobiklere

direnç geliştirme bakımından da günümüzün sorunlu bakterileri arasındadır (1). Enterokoklar beta laktam antibiyotiklere intrinsik olarak düşük düzeyde dirençlidirler. Bu dirençte rol oynayan mekanizma, düşük afiniteli penisilin bağlayan protein (PBP)'lerin üretilmesi ve özellikle de PBP-5'in miktarıyla orantılıdır (2). Enterokoklarda ilk kez 1983 yılında tesbit edilen ve aminoglikozid-beta laktam sinerjistik etkisinin kaybolmasına neden olan bir diğer penisiline direnç mekanizması ise oldukça nadir görülen beta laktamaz sentezidir. Beta laktamaz sentezi düşük düzeyde, edinsel ve inokulum miktarına bağlıdır. Penisilinaz geni, yüksek düzey gentamisin direnci (HLGR)'ne de neden olan bir plazmid üzerinde bulunmuştur (3,4). Bu enzim penisilin, ampisilin, üro-dopenisilinler ve daha az oranda karbenisilin ve tikarsilini inaktive edebilir. Nafsilin, sefalosporinler ve imipenem bu enzime dayanıklıdır. Enterokoklardaki beta laktamaz geninin DNA dizisinin stafilokoklardan bulunan beta laktamaz geni DNA dizisi ile %90 dan fazla benzerlik göstermesi nedeniyle, stafilokoklardan transfer edildiği tahmin edilmektedir (5,6).

Enterokoklar intrinsik olarak aminoglikozid antibiyotiklere de düşük düzeyde direnç gösterirler. Direncin nedeni hücre duvarının bu antibiyotiklere geçirgenliğinin düşük olmasıdır. Bu direnç problemi beta laktam antibiyotiklerle aminoglikozidlerin kombine verilmesi ile aşılabılır. Ancak aminoglikozidlere direnç gelişimindeki asıl problem kazanılmış dirençtir. Bu iki mekanizma ile ortaya çıkar. Bunlardan birincisi aminoglikozid antibiyotiklerin ribozomlardaki bağlanma yerinde değişiklik olmasıdır. Bu direnç mekanizması bakteriler arasında transfer edilemez ve yayılımı azdır. İkinci direnç mekanizması ise aminoglikozid modifiye eden enzimlerin sentezi ile oluşan dirençtir. Bu direnç enterokoklar arasında transfer edilebilir ve hızla yayılır. Bu durum beta laktam antibiyotiklerle aminoglikozidler arasındaki sinerjizmin kaybolmasına neden olur (2).

Bu çalışmanın amacı enterokoklarda beta laktamaz üretimini araştırmak ve yüksek düzey aminoglikozid direnci ile beta laktamaz üretimi arasında ilişki olup olmadığını değerlendirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mart-Ekim 2001 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanelerinde yatmakta olan 163 hastanın rektal sürüntü örnekleri alınmıştır. İzole edilen suşların safralı-eskülinli besiyerinde ve %6.5 NaCl'li besiyerinde üreme, koyun kanlı agarda hemoliz, katalaz, Gram boyama ve API 20 Strep (Bio-Merieux-France) testleri yapılarak cins ve düzeyinde tanıları yapılmıştır. Yüksek düzey aminoglikozid direnci NCCLS önerileri doğrultusunda standart agar tarama yöntemiyle araştırılmıştır (7). Bu amaçla iki farklı besiyeri hazırlanmıştır (500 µg/ml gentamisin içeren brain-heart infuzyon (BHI) agar ve 2000 µg/ml streptomisin içeren BHI agar). Beta laktamaz üretiminin araştırılmasında "Identification sticks β -lactamase (Nitrocefim)" (Oxoid) kullanılmıştır.

BULGULAR

İncelenen 163 rektal sürüntü örneğinin 116'sından enterokok izole edilmiştir. Suşların 67'si *Enterococcus faecalis*, 45'i *Enterococcus faecium*, üçü *Enterococcus casseliflavus* ve biri *Enterococcus avium* olarak tanımlanmıştır. Yüksek düzey aminoglikozid direnci gentamisin için suşların % 25.9'unda, streptomisin için %34.5'inde saptanmıştır. Yüksek düzey aminoglikozid direnci gösteren ve göstermeyen suşlar arasında beta laktamaz üreten enterokok suşuna rastlanmamıştır. Enterokok suşlarındaki yüksek düzey aminoglikozid direnç oranları Tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablo 1. Enterokok suşlarında yüksek düzey aminoglikozid direnci

Enterokok türleri	Yüksek düzey gentamisin direnci		Yüksek düzey streptomisin di-	
	n	(%)	n	(%)
<i>E. faecalis</i> (n = 67)	16	(23.9)	22	(32.8)
<i>E. faecium</i> (n = 45)	14	(31.1)	18	(40.0)
<i>E. casseliflavus</i> (n = 3)	-		-	
<i>E. avium</i> (n = 1)	-		-	
Toplam (n=116)	30	(25.9)	40	(34.5)

TARTIŞMA

Enterokoklar çevre koşullarına oldukça dayanıklı mikroorganizmalardır. Hastane yüzeylerinde birkaç gün canlı kalabilirler. Duyarlı veya dirençli suşlar yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda ve sağlık per-

sonelinde kolonize olabilirler. Kolonizasyon sağlıklı bireylerde infeksiyon oluşumu için bir risk oluşturmayabilir. Ancak özellikle yoğun bakımda yatan hastalarda ya da altta yatan hastalığı olanlarda bu bakterilerle kolonizasyon, infeksiyon için bir risk faktörüdür. Enterokoklar günümüzde kullanılmakta olan birçok antimikrobiyal maddeye dirençli olabilirler. Dirençli enterokok suşlarıyla kolonize olmuş hastanelerden bu bakterilerin eradikasyonu oldukça güçtür (8). Enterokoklardaki beta laktamlara olan direnç PBP lerdeki değişikliklerin yanında beta laktamaz üretimine de bağlı olabilir. Ancak bu üretim oldukça nadirdir ve çoğunlukla *E. faecalis* suşlarında mevcuttur. Rutin antibiyotiklere duyarlılık testleri PBP'lerdeki değişikliklere bağlı olarak gelişen direnci saptayabilir. Ancak, mikrodilüsyon veya disk difüzyon yöntemleri enterokoklardaki beta laktamlara bağlı direnci saptayamaz. Bu tip izolatlarla nitrosetin testi uygulanmalıdır. PBP kaynaklı bir direncin sözkonusu olmadığı ancak beta laktamaz testi pozitif olan bir izolat, penisilin, ampisilin ve ürodozopenisilinlere dirençli, imipenem ve beta laktam/beta laktamaz inhibitör kombinasyonlarına duyarlı kabul edilir (6).

Kazanılmış aminoglikozid direncine sahip bazı enterokok suşları aynı zamanda beta laktamaz üretme yeteneğini de kazanmış olabilirler (9). Yapılan bir çalışmada 1506 *E. faecalis* suşundan 124'ünde beta laktamaz üretimi ve yüksek düzey gentamisin direncinin birlikte olduğu saptanmıştır. Bu direncin, enterokok izole edilen hastaların Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) II skorunun altıdan büyük olması ve daha önce antibiyotik kullanımı ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır (10).

Fransa'da yapılan iki ayrı çalışmada izole edilen *E. faecalis* suşlarının %7.1 inde ve *E. faecium* suşlarında %18.7 oranında HLGR saptanmış olmasına karşın her iki çalışmada da beta laktamaz üreten suş saptanmamıştır (11,12). Polonya'da yapılan çalışmada *E. faecalis* suşlarında %62 ve *E. faecium* suşlarında ise %89 oranında HLR saptanmış olmasına karşın, hiçbir suşta beta laktamaz üretimi saptanmamıştır. Bu çalışmada olduğu gibi ülkemizde ve başka birçok ülkede yapılan çalışmaların çoğunda da, enterokoklarda beta laktamaz üretimine rastlanmamıştır (13-18).

Yüksek düzey gentamisin direnci taşıyan genle beta laktamaz üreten genin aynı plazmid üzerinde taşındığını bildiren yayınlar olmasına karşın, çalışmamızda yüksek düzey gentamisin direnci ile beta laktamaz üretimi arasında bir ilişki saptanmamıştır.

KAYNAKLAR

- 1.Çetinkaya Şardan Y: Enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. İnfek Hast Ser 5 : 61 (2002).
- 2.Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG: Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 13: 686 (2000).
- 3.Wells VD, Wong ES, Murray BE, Coudron PE, Williams DS, Markowitz SM: Infections due to beta-lactamase-producing, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Ann Intern Med 116:285 (1992).
- 4.Chow JW, Perri MB, Thal LA, Zervos MJ: Mobilization of the penicillinase gene in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 37:1187 (1993).
- 5.Bonafede ME, Carias LL, Rice LB: Enterococcal transposon Tn5384: evolution of a composite transposon through cointegration of enterococcal and staphylococcal plasmids. Antimicrob Agents Chemother 41:1854 (1997).
- 6.Başustaoğlu A. Aydoğan H: Enterokoklar. İnfek Hast Ser 5: 45 (2002).
- 7.NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eleventh Informational Supplement. NCCLS document M100-S11 [ISBN 1-56238-426-0]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 U.S.A., (2001).
- 8.Jones RN, Low DE, Pfaller MA: Epidemiologic trends in nosocomial and community-acquired infections due to antibiotic-resistant gram-positive bacteria: the role of streptogramins and other newer compounds. Diagn Microbiol Infect Dis 33: 101 (1999).
- 9.Brown S, Ross TW: Vancomycin-resistant enterococcus : Implications for pharmacy. Inet-CE-Continuing Education for Pharmacists. Expires 04/14/2002. <http://inetce.com/articles/146-000-99-001-H01.html>.
- 10.Wells VD, Wong ES, Murray BE, Coudron PE, Williams DS, Markowitz SM: Infections due to beta-lactamase-producing, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Ann Intern Med 116:285 (1992).
- 11.Mulin B, Bailly P, Thouverez M, Cailleaux V, Cornette C, Dupont MJ: Clinical and molecular epidemiology of hospital *Enterococcus faecalis* isolates in eastern

France. Clin Microbiol Infect 5:149 (1999).

12. Bertrand X, Thouverez M, Bailly P, Cornette C, Talon D: Clinical and molecular epidemiology of hospital Enterococcus faecium isolates in eastern France. Members of Reseau Franc-Comtois de Lutte contr les Infections Nosocomiales. J Hosp Infect 45:125 (2000).

13. Sawicka-Grzelak A, Rokosz A, Luczak M: Drug resistance of 100 clinical strains of Enterococcus spp. Med Dows Microbiol 51: 239 (1999).

14. Haşçelik G, Gür D, Özkuyumcu C, Akalın HE: Enterokoklarda aminoglikosid, glikopeptid ve beta-laktam direncinin araştırılması. ANKEM 7: 51 (1993).

15. Karadenizli AY, Kolaylı F, Budak F: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterococcus türlerinin saptanması ve beta laktamaz aktiviteilerinin araştırılması 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Özet Kitabı s13 (1999).

16. Hsieh SR: Antimicrobial susceptibility and species identification for clinical isolates of enterococci. J Microbiol Immunol Infect 33:253 (2000).

17. Hoyos A, Gutierrez J, Piedrola G: Pattern of antimicrobial susceptibility of enterococci strains Rev Med Chil 123: 473 (1995).

18. Joyanes P, Pascual A, Suarez AI, Martinez-Martinez L: False sensitivity of Enterococcus faecium to amoxicillin-clavulanic acid with the MicroScan system. Enferm Infecc Microbiol Clin 13:96 (1995).