

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOKLARIN MOLEKÜLER ANALİZİ

MOLECULAR ANALYSIS OF VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

Abdullah KILIÇ*, **Zeynep ŞENSES***
Hakan AYDOĞAN*, **Ahmet BAŞUSTAĞLU***

ÖZET: Enterokok türleri sağlıklı kişilerin gastrointestinal florasında yer almakta ve endokardit, üriner sistem ve kan akımı enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. Son yıllarda ülkemizde vankomisin dirençli enterokokların (VDE) neden olduğu enfeksiyonların sayısında artış olmuştur. VDE enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin veya teikoplanin gibi glikopeptid grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. VDE’larda yedi farklı direnç geni tanımlanmış olmasına rağmen Türkiye’de en sık *VanA* tip fenotipik direnç tespit edilmiştir. Bu çalışmada, daha önceden hastanemizde izole edilen dört vankomisin dirençli enterokok izolatının “pulsed field” jel elektroforezi (PFGE) ile genotiplendirilmesi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile direnç genlerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya alınan suşlar, 2000–2004 yılları arasında üçü kan kültüründen biri de beyin omurilik sıvısından izole edilen ve hem konvansiyonel yöntemlerle hem de ticari kit kullanılarak tür düzeyinde tanımlanan vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VDEF) suşlarıdır. PFGE ile izolatların Tenover kriterlerine göre farklı oldukları ve PCR ile *VanA* tip direnç geni taşıdıkları tespit edilmiştir. Sonuç olarak, hastanemizde *VanA* genotip VDE’ların sporadik olarak enfeksiyonlara neden olduğu söylenebilir. Enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmalar arasındaki genotipik ilişkinin gösterilmesi enfeksiyonların izlenmesinde önemlidir.

Anahtar sözcükler: *Vankomisin dirençli enterokok, polimeraz zincir reaksiyonu, pulsed field gel electrophoresis.*

ABSTRACT: Enterococcus species are the inhabitants of gastrointestinal flora and can cause endocarditis, urinary tract infections, and bacteremia. In recent years, infections caused by vancomycin-resistant enterococci (VRE) have increased in our country. The infections caused by VRE are treated with glycopeptide antibiotics like vancomycin and teicoplanin. Although seven different resistant genes have been described in VRE, *VanA* is the most frequently detected one in Turkey. The aim of this study was (i) to genotype four vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated in our hospital, by using pulsed field gel electrophoresis (PFGE); and (ii) to detect the type of *Van* gene by using polymerase chain reaction. Three of the strains were isolated from blood cultures

* GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Etlik, Ankara.

and one from cerebrospinal fluid of the hospitalized patients between the years 2000–2004, and identified by both conventional methods and commercial kits. By using PFGE, we detected that isolates were different according to Tenover criteria and they had *VanA* genes. As a result, *VanA* carrying VRE cause sporadic infections in our hospital. The molecular epidemiologic investigation of resistant microorganisms is important in terms of infection control and epidemiology.

Key words: Vancomycin-resistant enterococci, polymerase chain reaction, pulsed field gel electrophoresis.

GİRİŞ

Enterokokların çoğu sağlıklı insanların intestinal florasında bulunmasına rağmen, endokardit, bakteriyemi, üriner sistem enfeksiyonları ve neonatal sepsis gibi hastane enfeksiyonlarına neden etkeni olabilmektedir^{1,2}.

Vankomisine dirençli enterokok (VDE) ilk izole edildiği 1980'li yıllardan beri ciddi enfeksiyonlara neden olan önemli bir mikroorganizmadır. Bu patojen hastane kaynaklı bakteriyemilerin üçüncü sıklıkla nedenidir³. Enterokoklarda yedi farklı glikopeptid direnç genotipi (*VanA*, *VanB*, *VanC1*, *VanC2/C3*, *VanD*, *VanE*, *VanG*) tanımlanmış olmasına rağmen, *VanA* ve *VanB* en sık görülen direnç genotipleridir. *VanA* tip genotip enterokoklar hem teikoplanin hem de vankomisine yüksek düzey direnç gösterirken, *VanB* tip genotip enterokoklar sadece vankomisine dirençlidirler⁴.

Bu çalışmada, hastanemizde izole edilmiş olan ve kültür koleksiyonumuzda saklı bulunan dört vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* (VDEF) izolatının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile direnç genlerinin tespit edilmesi ve "pulsed field" jel elektroforezi (PFGE) ile genotiplendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızdaki 1 no'lu izolat⁵ ile 4 no'lu izolat⁶ daha önce, PFGE görüntüsü olmaksızın, olgu sunumu şeklinde yayınlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriyel İzolatlar: 2000–2004 yılları arasında üçü kan kültüründen biri de beyin omurilik sıvısından olmak üzere dört VDEF izolatı çalışmaya alındı (Tablo I). İzolatlar hem konvansiyonel yöntemlerle hem de ticari kit kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı. İzolatlar çalışmaya başlamadan önce –70°C'de, %15 gliserollü triptikaz soy buyyon (Merck, Darmstadt, Almanya) içerisinde saklandı. Kontrol izolatları olarak *Enterococcus faecium* B7641 (*VanA*), *Enterococcus faecalis* V583 (*VanB*), *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788 (*VanC2*) (Robin Patel tarafından sağlandı) ve *E. faecium* ATCC 6057 (glikopeptid duyarlı izolat) kullanıldı.

Tablo I: Çalışmaya Alınan İzolat Bilgileri

İzolat No.	Hasta Örneği	Klinik	Yıl
1	Kan	Hematoloji	2001
2	Kan	Nefroloji	2003
3	Kan	Nefroloji	2003
4	Beyin omurilik sıvısı	Beyin Cerrahisi	2004

Duyarlılık Testleri: Vankomisin ve teikoplanin için minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK), E-test (AB-Biodisk, Solna, İsveç) ile "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) standartlarına göre yapıldı ve değerlendirildi^{7,8}.

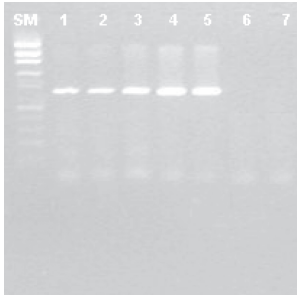
DNA İzolasyonu: DNA izolasyonu kaynatma metodu kullanılarak yapıldı⁹.

PCR: *VanA* primerler (GGGAAAACGACAATTGC ve GTACAATGCGGCCGTTA, 732 bp) *Enterococcus* türlerinde *VanA* genini tespit etmek için kullanıldı². *VanB* (TACCTACCCTGTCTTTGTGAAGCC ve CTTTTCCGGCTCGTTTTCTGATG, 263 bp) ve *VanC-2* [GTTTTCTTTAAGCCTAATGAAGC(GT)G primerler de *Enterococcus* türlerinde *VanB* ve *VanC-2* genlerini tespit etmek için kullanıldı¹⁰. Otuz beş siklus PCR amplifikasyonu sonunda elde edilen ürünün 5 µL'si jel elektroforezde (%1.5 agarose, 1xTBE, 100V) 100-bp moleküler standart (K180-250 UL, Amresco, USA) kullanılarak yürütüldü. Jel etidyum bromid ile boyandı ve UV (Gel Doc 2000, BIO-RAD, USA) kullanılarak görüntüledi. Her bir örnek için PCR iki kez yapıldı.

PFGE Yöntemi: PFGE tiplendirme *SmaI* enzimi kullanılarak daha önce tanımlanan yöntemlerin modifiye edilmesi ile yapıldı¹¹. Yaklaşık 2x10⁹ hücre/ml bakteri süspansiyonu eşit miktarda %1.6'lık düşük erime ısıları agaroz ile karıştırıldı. Karışımdan bloklar hazırlandı ve 4°C'de 15 dakika bekletildi. Bloklar 37°C'de bir gece uygun solüsyonda (her ml'de 1 mg lizozim, 25 µg RNase, 6 mM Trizma base, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.5% Brij 58, 0.2% sodium deoxycholate, 0.5% lauroylsarcosine, ve 1 mM MgCl) ve sonra 50°C'de proteinaz K solüsyonunda (her ml'de 100 µg proteinaz K ve 1% laurilsarkozin) bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bloklar 3 kez TE solüsyonunda (10 mM Trizma base, 1 mM EDTA) 4°C'de yıkandı. Bloklar 40 U *SmaI* enzimi ile 4 saat kesildi. Elektroforez TBE solüsyonunda (44.5 mM Trizma base, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA) CHEF-DR11 drive module (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel Hempstead, İngiltere) cihazında başlangıç zamanı 1 saniye ve bitiş zamanı 20 saniye olacak şekilde 21 saat olarak yapıldı. Jel etidyum bromid (1 µg /ml) ile boyandı ve fotoğraflandı.

B U L G U L A R

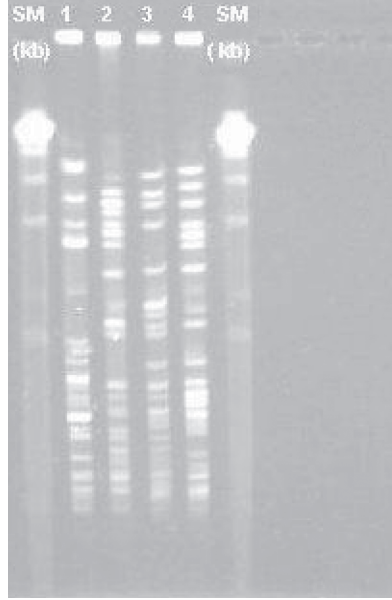
Antibiyotik duyarlılık çalışmasının sonunda, tüm izolatlar vankomisin ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençli (MİK>256 mg/L) bulunmuştur. PCR ile izolatların tümünde *VanA* geni pozitif olarak saptanmış (Şekil 1), *VanB* ve *VanC-2* geni tespit edilmemiştir. PFGE yöntemiyle izolatların Tenover kriterlerine¹² göre 4 farklı pulstotipe olduğu görülmüştür. Jel görüntüleri Şekil 2'de sunulmaktadır.



Şekil 1:

SM: DNA büyüklük belirteci.

1. *E.faecium* B7641;
2. *E.faecium* (1. test izolatı);
3. *E.faecium* (2. test izolatı);
4. *E.faecium* (3. test izolatı);
5. *E.faecium* (4. test izolatı);
6. *E.faecium* ATCC 6057 (negatif kontrol);
7. Su kontrol.



Şekil 2: PFGE görüntüleri.

TARTIŞMA

Mikroorganizmaların birbirleri ile klonal ilişkilerinin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. PFGE metodu enterokokların tiplendirilmesinde özellikle bölgesel salgınlarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır¹³. Enterokoklar ve özellikle de *E.faecium* hastane enfeksiyonlarına sık neden olması ve antibiyotiklere direnç kazanma potansiyellerinin yüksek olması nedeniyle önemli bir sorun teşkil etmektedirler¹¹.

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa ülkelerinde *VanA* fenotip direnç, diğerlerine oranla daha yaygın bulunmaktadır^{14,15}. Diğer enterokok türleri ile kıyaslandığında ise *E.faecium*'da *VanA* fenotip direncin daha sık ortaya çıktığı görülmektedir¹⁶. Avrupa'da özellikle hayvancılıkta bir glikopeptid analogu olan avoparsin kullanımı, *VanA* fenotip VDE'nin artışına neden olmaktadır¹⁷. Bizim izolatlarımızın da beklenen şekilde *VanA* direnç genine sahip olduğu tespit edilmiştir.

VDE çalışma grubunun 2000 yılında yaptığı çalışmada Türkiye'de *VanA* ve *VanB* fenotip enterokok izolatları saptanmamıştır¹⁷. Türkiye'de ilk kez *VanA* fenotip *E.faecium* hastanemizde izole edilmiştir⁵. Daha sonra başka bir merkezde 2002 yılında *VanA* fenotip *E.faecium* salgını bildirilmiştir¹⁸. Kılıç ve arkadaşları¹⁰, Ankara'da bir çocuk hastanesinde *VanA* geni içeren *E.faecium* izolatlarına bağlı gelişen salgını ve izolatların 10 farklı pulsotipe ayrıldığını bildirmişlerdir. Bizim izolatlarımızın da birbirleri ile ilişkili olmadıkları ve hastane ortamından horizontal olarak kazanıldığı düşünülmektedir. Her dört izolatin da izole edildiği tarihlerde alınan ortam kültürlerinin hiçbirisinde VDE tespit edilmemiştir^{5,6}.

Sonuç olarak, hastanemizde *VanA* genotip VDE'lar sporadik olarak enfeksiyonlara neden olmaktadır. Direnç genotipinin tespit edilmesi ve izolatlar arasındaki klonal ilişkinin gösterilmesi özellikle dirençli mikroorganizmalar ile ortaya çıkan enfeksiyonların izlenmesinde önemlidir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de *VanA* tipi direncin sorun oluşturabileceği ve plazmid ile aktarılabilmesi nedeniyle *VanA* tipi direnç gösteren VDE'lara bağlı enfeksiyonların öneminin artabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Elsner HA, Sobottka I, Feucht HH, et al. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at a German university pediatric hospital. Int J Hyg Environ Health 2000; 203: 147–52.
2. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 1434.
3. Jayaratne P, Rutherford C. Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR. J Clin Microbiol 1999; 37: 2090–2.
4. Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Claverie-Martin F. A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 42: 273–7.
5. Basustaoglu A, Aydogan H, Beyan C, Yalcin A, Unal S. First glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolate from blood culture in Ankara, Turkey. Emerg Infect Dis 2001; 7: 160–1.
6. Baysallar M, Izci Y, Kilic A, Avci IY, Senses Z, Doganci L. A case of ventricular drainage infection with a rare pathogen in cerebrospinal fluid: vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Microb Drug Resist 2006; 12: 59–62.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, NCCLS Document M100–S12. 2002; 5th ed. NCCLS, Wayne, PA.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighth informational supplement. NCCLS Document M100–S8. 2000; NCCLS, Villanova, PA.
9. Bell JM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. J Clin Microbiol 1998; 36: 2187–90.
10. Kilic A, Demiray T, Saracli MA, et al. Bacteriological characterization of vancomycin-resistant enterococci in a pediatric hospital in Turkey. Ann Microbiol 2004; 54: 543–51.
11. Morrison D, Woodford N, Barrett SP, Sisson P, Cookson BD. DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. J Clin Microbiol 1999; 37: 1084–91.
12. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233–9.
13. Tomayko JF, Murray BE. Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1995; 33: 2903–7.
14. Moellering RC Jr. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis 1998; 26: 1196–9.
15. Descheemaeker P, Ieven M, Chapelle S, et al. Prevalence and molecular epidemiology of glycopeptide-resistant enterococci in Belgian renal dialysis units. J Infect Dis 2000; 18: 235–41.
16. Padiglione AA, Grabsch EA, Olden D, et al. Fecal colonization with vancomycin-resistant enterococci in Australia. Emerg Infect Dis 2000; 6: 534–6.
17. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A; European VRE Study Group: Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 816–22.
18. Colak D, Naas T, Gunseren F, et al: First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 397–401.