

Enterokok Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Mikrodilüsyon Yöntemi ile Phoenix Otomatize Sisteminin Karşılaştırılması*

Comparison of Microdilution Method and Phoenix Automated System for Testing Antimicrobial Susceptibilities of *Enterococcus* Strains

Dolunay GÜLMEZ, Gülşen HASÇELİK

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

* Bu çalışmanın bir kısmı, XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (IUMS) kongresi (5-9 Ağustos 2008, İstanbul)'nde sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 22.09.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.10.2010

ÖZET

Enterokoklar aminoglikozidler ve sefalosporinler gibi yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere dirençli olan önemli patojenlerdir. Uygun antimikrobiyal tedavinin verilebilmesi için direncin doğru olarak belirlenmesi önemlidir. Bu çalışmanın amacı, enterokokların antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanmasında Phoenix sisteminin (Becton Dickinson, ABD), referans mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırılmasıdır. Çalışmaya, 2005-2007 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesi rutin mikrobiyoloji laboratuvarında klinik örneklerden izole edilen 1248 *Enterococcus* spp. (903 *Enterococcus faecalis*, 345 *Enterococcus faecium*) suşu alınmıştır. Suşlar Phoenix sistemi tarafından tanımlanmış; ampisilin, teikoplanin, vankomisin, gentamisin ve streptomisin duyarlılıkları Phoenix sistemi ve mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır. İki yöntem arasındaki kategori uyumu oranları tüm antibiyotiklerde %97'nin üzerinde hesaplanmıştır. Çalışılan 1248 suştan 76 tanesinde uyumsuz sonuçlar gözlenmiştir. Çok büyük hata oranları ampisilinde %1.5, gentamisinde %1.3, streptomisinde ise %0.9 olarak belirlenmiştir. Büyük hata oranlarının streptomisin için %1.4, ampisilin ve vankomisin için %0.6, gentamisin için %0.3 olduğu görülmüş; küçük hata oranları ise vankomisinde %0.2, teikoplaninde %0.1 olarak saptanmıştır. Mikrodilüsyonla elde edilen direnç oranları; streptomisin için %44, gentamisin için %29.7, ampisilin için %25.6,

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Dolunay Gülmez, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06100 Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 305 1560, **E-posta (E-mail):** dolunay@hacettepe.edu.tr

vankomisin için %2.2 ve teikoplanin için %2.2 olarak bulunmuştur. *E.faecium*'da direnç oranlarının *E.faecalis*'e göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Vankomisine dirençli enterokokların %96.4'ü *E.faecium* olarak tanımlanmıştır. Sonuç olarak elde edilen verilere göre, enterokokların antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde, Phoenix sistemi, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)"un önerdiği mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırıldığında, güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, vankomisine dirençli enterokok tanısının hasta ve hastane açısından ayrı bir öneme sahip olması nedeniyle, Phoenix sisteminde vankomisin direnci saptandığında mikrodilüsyon yöntemiyle doğrulanması önerilmektedir.

Anahtar sözcükler: *Enterococcus*; antibiyotik duyarlılık testleri; mikrodilüsyon; Phoenix sistemi.

ABSTRACT

Enterococcus spp. are important pathogens which are intrinsically resistant to most of the commonly used antimicrobial agents such as aminoglycosides and cephalosporins. Accurate determination of resistance is important to ensure appropriate antimicrobial therapy. This study was undertaken to compare the susceptibility results obtained by Phoenix system (Becton Dickinson, USA) with reference microdilution method. We included 1248 *Enterococcus* spp. (903 *Enterococcus faecalis*, 345 *Enterococcus faecium*) strains isolated from clinical samples between 2005-2007 in routine microbiology laboratory of Hacettepe University Hospital. The strains were identified and the antimicrobial susceptibilities were determined by the Phoenix system. Antimicrobial susceptibilities to ampicillin, teicoplanin, vancomycin, gentamicin and streptomycin were also studied by microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Evaluation revealed excellent agreement for all of the antibiotics with category agreement rates of > 97%. Among 1248 strains, 76 revealed discordant results. Very major error rates were 1.5% for ampicillin, 1.3% for gentamicin, and 0.9% for streptomycin. Major error rates were 1.4% for streptomycin, 0.6% for ampicillin and vancomycin and 0.3% for gentamicin. Minor error rates were found as 0.2% for vancomycin, and 0.1% for teicoplanin. Resistance rates obtained by microdilution were as follows; high level streptomycin 44%, high level gentamicin 29.7%, ampicillin 25.6%, vancomycin 2.2% and teicoplanin 2.2%. Resistance rates were higher in *E.faecium* than *E.faecalis* and 96.4% of the vancomycin resistant enterococcus isolates were identified as *E.faecium*. In conclusion, based on the data obtained, Phoenix system is reliable for testing susceptibilities of *Enterococcus* spp. to these antimicrobials. Since isolation of vancomycin resistant enterococci has an important impact in terms of hospital infection control, vancomycin resistance reported by the Phoenix system should be confirmed with an alternative susceptibility testing method.

Key words: *Enterococcus*; antimicrobial susceptibility testing; microdilution; Phoenix system.

GİRİŞ

Enterokoklar sepsis, menenjit, endokardit gibi ciddi enfeksiyonlara yol açabilen yaygın ve önemli patojenlerdir^{1,2}. Bu bakteriler aminoglikozid, sefalosporin, klindamisin ve trimetoprim-sülfametoksazol gibi yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı doğal direnç göstermekte, bunların neden oldukları enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri sınırlı kalmaktadır^{1,3}. Enterokokların neden oldukları ciddi enfeksiyonların tedavisinde genellikle penisilin veya ampisilin ile birlikte aminoglikozidler kullanılmaktadır. Yüksek düzey aminoglikozid direnci varlığında, bu kombinasyonun etkili olabilmesi için yeterli sinerjistik etki sağlanamamakta ve vankomisin ilk tercih edilen antibiyotik olmaktadır¹. Bu neden-

le enterokoklarda antibiyotik direncinin, özellikle glikopeptid direncinin doğru saptanması kritik önem taşımaktadır. "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" enterokoklarda mikrodilüsyon yöntemini önermektedir. Bunun yanında sonuçların tekrarlanabilirliği, tür düzeyinde tanımlamanın yapılabilmesi, aynı anda antibiyotik duyarlılık değerlerinin verilmesi, kısa sürede sonuçların rapor edilebilmesi, epidemiyolojik verilerin daha kolay ulaşılabilmesi ve maliyetin azaltılması gibi avantajlar, otomatize tanımlama ve duyarlılık saptama yöntemlerinin tercih edilmesine neden olmaktadır^{4,5}.

Bu çalışmada, enterokokların antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanmasında Phoenix sisteminin (Becton Dickinson, USA) güvenilirliğinin belirlenmesi amacıyla referans mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırması yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 2005-2007 tarihleri arasında izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşları alındı. Phoenix sistemi, *Enterococcus casseliflavus* ve *Enterococcus gallinarum* suşlarının glikopeptid duyarlılık durumunu, bulduğu minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerinden bağımsız olarak dirençli rapor ettiği için bu türler çalışmaya dahil edilmedi⁶. Bir hastadan birden fazla suş çalışmaya alınmadı, ancak aynı hastada farklı vücut bölgelerinden izole edilen suşlar çalışmaya dahil edildi. İzolatlar üreticinin talimatları doğrultusunda Phoenix sistemi tarafından tanımlandı ve antibiyotik duyarlılıkları belirlendi. Ampisilin, teikoplanin, vankomisin, gentamisin ve streptomisin duyarlılıkları ayrıca mikrodilüsyon yöntemiyle CLSI önerilerine uygun şekilde çalışıldı³. Yöntemlerden herhangi biri ile vankomisin direnci saptandığında, vankomisin duyarlılığı E-test yöntemi (AB Biodisk, Solna) ile de çalışıldı. Sonuçlar arasında uyumsuzluk olması durumunda, testler tekrarlandı. Direnç oranları hesaplanırken, MİK değerine göre orta derecede duyarlı (OD) olan suşlar dirençli (D) kategorisine alındı. Değerlendirmede kategori uyumu (category agreement), çok büyük hata (very major discrepancy), büyük hata (major discrepancy) ve küçük hata (minor discrepancy) oranları hesaplandı⁷.

BULGULAR

Çalışma süresi boyunca izole edilen 903'ü *E. faecalis*, 345'i *E. faecium* olmak üzere toplam 1248 *Enterococcus* spp. çalışmaya alınmıştır. Çalışılan 1248 suştan 159'unda iki yöntem ile elde edilen sonuçlar arasında uyumsuzluk gözlenmiş ve bu suşlarda önce mikrodilüsyon testi tekrarlanmış, uyumsuzluğun sürmesi durumunda Phoenix sistemi ile yeniden duyarlılık belirlenmiştir. Ancak, 76 suшта uyumsuzluk devam etmiştir. İki yöntem arasındaki farkın değerlendirilebilmesi amacıyla hesaplanan kategori uyumu, tüm antibiyotiklerde %97'nin üzerinde bulunmuş ve yöntemler arasındaki uyum mükemmel olarak değerlendirilmiştir (Tablo I). Antibiyotikler için saptanan çok büyük, büyük ve küçük hata oranları Tablo I'de görülmektedir.

E. faecium ve *E. faecalis* için mikrodilüsyon ile elde edilen direnç oranları Tablo II'de verilmiştir. *E. faecium*'da saptanan direnç oranlarının *E. faecalis*'e göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Tablo I. Enterokok Suşlarında Mikrodilüsyon Yöntemi ve Phoenix Sistemi ile Elde Edilen Antibiyotik Duyarlılık Sonuçlarının Karşılaştırılması

Antibiyotik	Kategorik uyum (%)	İzolat sayısı (%)		
		Küçük hata	Büyük hata	Çok büyük hata
Ampisilin	97.9	-	7 (0.6)	19 (1.5)
Teikoplanin	99.9	1 (0.1)	0 (0)	0 (0)
Vankomisin	99.2	2 (0.2)	7 (0.6)	0 (0)
Gentamisin	98.4	-	4 (0.3)	16 (1.3)
Streptomisin	97.7	-	18 (1.4)	11 (0.9)

Tablo II. Enterokok Suşlarında Mikrodilüsyon Yöntemiyle Elde Edilen Antimikrobiyal Direnç Oranları (Orta Derecede Duyarlı = Dirençli)

Suş (sayı)	Ampisilin		Teikoplanin		Vankomisin		Gentamisin		Streptomisin	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<i>E. faecalis</i> (903)	26	2.9	1	0.1	1	0.1	153	16.9	293	32.4
<i>E. faecium</i> (345)	294	85.2	27	7.8	27	7.8	218	63.2	256	74.2
Toplam (1248)	320	25.6	28	2.2	28	2.2	371	29.7	549	44.0

TARTIŞMA

Otomatize sistemler mikrobiyoloji laboratuvarlarında iş yükünü azalttıkları ve daha kısa sürede sonuç verebildikleri için avantaj sağlamaktadırlar. Ayrıca, sonuçların değerlendirilmesi ve raporlanmasında nesnelliğin ön plana çıkması ve kayıtların daha iyi tutulmasına sağladığı katkılar da belirtilmektedir. Tenover ve arkadaşlarının⁸ geleneksel yöntemlerle otomatize sistemleri karşılaştırdıkları çalışmalarında, deneyimi yetersiz kalan teknisyenlerin geleneksel duyarlılık testlerini yanlış yorumlayabilecekleri vurgulanmaktadır. Çalışan teknisyenlere gerekli eğitim verildikten sonra enterokoklarda vankomisin agar tarama plaklarının değerlendirilmesi ve disk difüzyon testinde *vanB* geni taşıyan suşlarda zon çevresindeki hafif üremelerin saptanması daha doğru yapılabilmektedir⁸. Başka bir çalışmada, zon çapları ölçümünün -özellikle iş yükünün ağır olduğu laboratuvarlarda- sıkıcı, zaman alıcı ve ölçüm hatalarına açık bir yöntem olduğundan söz edilmektedir⁵. Otomatize sistemlerin kullanımı ile ilişkili tüm avantajlar, sistemin güvenilir olduğu durumlarda geçerli olabilmektedir. Antibiyotik duyarlılık testlerinde güvenilirliğin belirlenmesi için ilgili sistemin referans yöntemlerden biri ile karşılaştırılması gerekmektedir. Karşılaştırma sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, kategori uyumunun ve esas uyumun (essential agreement, EU) > %89.9, çok büyük hata oranının ≤ %1.5, büyük hata oranının ≤ %3 ve sistemde üremeyen suş oranının < %10 olması önerilmektedir⁷.

Literatürde otomatize sistemlerin antibiyotik direncini belirlemekte güvenilirliğini test eden farklı yayınlar bulunmaktadır. Fahr ve arkadaşları⁹ 469 enterokok suşunda antibiyotik duyarlılık testlerinin değerlendirilmesinde Phoenix sistemini mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Buldukları kategori uyumu değerleri; ampisilin için %99.4, teikoplanin için %99.4, vankomisin için %98.8, gentamisin yüksek direnç için %98.2 ve streptomisin yüksek direnç için %98.2'dir. Enterokoklar için önemli bir ajan olan ampisilinde çok büyük hata saptanmamıştır. Tüm vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşları doğru saptanmış ancak, bir suş yanlışlıkla VRE olarak bildirilmiştir⁹. Donay ve arkadaşları⁵ referans disk difüzyon yöntemi ile Phoenix sistemini karşılaştırmış ve enterokoklarda ampisilin, teikoplanin ve gentamisin yüksek direnci için kategori uyumunu %100 olarak belirlemişlerdir. Vankomisin için bu oran %92.5 olarak bulunmuş, bunun küçük hata oranlarındaki fazlalıktan kaynaklandığı ve çok büyük hata bulunmadığı belirtilmiştir⁵. Carroll ve arkadaşları¹⁰, enterokoklarda antibiyotik duyarlılık testlerinin değerlendirilmesinde Phoenix sisteminin performansını, referans olarak agar dilüsyon yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada, ampisilin, vankomisin, tetrasiklin ve furantoin için kategori uyumu %100, esas uyum %99.3 olarak hesaplanmış ve tüm VRE suşları doğru tanımlanmıştır. Araştırmacılar, enterokoklarda antibiyotik duyarlılığının saptanmasında Phoenix sisteminin güvenilir olduğu ve VRE için ek tarama testlerine gerek olmadığı sonucuna varmışlardır¹⁰. Phoenix sistemini E-test yöntemi ile karşılaştıran Brigante ve arkadaşları⁴ ise *E.faecium* suşlarında teikoplanin için kategori uyum değerini %87.5 olarak bulmuş, bunun dışındaki tüm antibiyotiklerde kategori uyumunu > %90 olarak saptamışlardır. Literatürde enterokoklarda otomatize sistemlerde saptanan antibiyotik direncinin referans yöntemlerle karşılaştırıldığı Türkiye'de yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda saptanan kategori uyumu değerleri > %97, çok büyük hata ve büyük hata oranları ≤ 1.5 olup, "Food and Drug Administration (FDA)" tarafından önerilen sınırlarda bulunmuştur (Tablo II). Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur.

VRE tanısı hasta ve hastane açısından ayrı bir öneme sahiptir. VRE'nin hızlı ve doğru olarak saptanması, hastanın uygun tedaviyi alabilmesi kadar hastane enfeksiyonlarının önlenmesi için de hayati önem taşımaktadır. Ülkemizdeki hastanelerde de VRE sürveyans çalışmaları başlatılmış, VRE'ye bağlı kolonizasyon ve enfeksiyonlar bildirilmiştir¹¹⁻¹³. VRE ile enfekte hastalarda tedavi başarısızlığı maliyeti artırmaktadır¹⁴. Ayrıca, VRE'lerde etkin olan sınırlı sayıdaki antimikrobiyal ajanlara karşı direnç de bildirilmiştir. Hem vankomisin hem de linezolid dirençli suşlarla gelişen bir salgında, bu suşla enfekte olan hastalarda hastanede kalış süresi, morbidite ve mortalitenin daha fazla olduğu gözlenmiştir¹⁵. Bizim çalışmamızda Phoenix sisteminin VRE suşlarını başarıyla tespit ettiği görülmüştür. Vankomisine duyarlı 7 (%0.6) suşun Phoenix sistemi ile dirençli olarak rapor edilmesi dikkat çekmiştir. Bu durum literatürde de göze çarpmaktadır⁹. VRE tespit edilen hastalarda tedavi seçenekleri oldukça kısıtlanmakta ve hastanın izole edilmesi hastaneye ek iş gücü ve maliyet getirmektedir. Bunlar göz önüne alındığında, Phoenix sistemi tarafından vankomisin direnci saptanan suşlarda direncin ek bir yöntem ile doğrulanması uygun olabilecektir.

E.faecium suşlarında antimikrobiyal direnç oranları *E.faecalis*'e göre daha yüksek seyretmektedir¹⁶. Ülkemizden bildirilen oranlar da bunu desteklemektedir¹⁷. Kaçmaz ve arkadaşları¹⁷, antimikrobiyal direnç oranlarını *E.faecalis* ve *E.faecium* için sırasıyla; ampisiline %11 ve %77, tetrasikline %67 ve %71, siprofloksasine %15 ve %59, levofloksasine %8 ve %47, norfloksasine %41 ve %53, eritromisine %34 ve %77, kloramfenikole %30 ve %35, rifampine %58 ve %65 olarak rapor etmişler, yüksek düzey gentamisin direncini ise %8 ve %41 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da test edilen tüm antibiyotikler için *E.faecium*'da direnç oranları daha yüksek bulunmuştur (Tablo II). Ayrıca, saptanan 28 VRE izolatının 27 (%96.4)'sinin *E.faecium* olduğu gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre, Phoenix sisteminin enterokoklarda ampisilin, teikoplanin, vankomisin, gentamisin ve streptomisin duyarlılıklarının belirlenmesinde güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, vankomisin direnci saptandığında alternatif bir yöntemle doğrulama önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızın istatistiksel değerlendirmelerindeki yardımı nedeniyle Jale Karakaya'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. The gram-positive cocci: Part II: Streptococci, Enterococci, and the "Streptococcus-like" bacteria, pp: 577-649. In: Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn WC (eds). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. 1997, Lippincott-Raven, Philadelphia.
2. Celebi S, Hacimustafaoglu M, Ozdemir O, Ozakin C. Nosocomial gram-positive bacterial infections in children: results of a 7 year study. *Pediatr Int* 2007; 49(6): 875-82.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventeenth Informational Supplement. M100-S17, 2007. CLSI, Wayne, PA.
4. Brigante G, Luzzaro F, Pini B, et al. Drug susceptibility testing of clinical isolates of streptococci and enterococci by the Phoenix automated microbiology system. *BMC Microbiol* 2007; 7: 46-52.
5. Donay J, Mathieu D, Fernandes P, et al. Evaluation of the automated Phoenix system for potential routine use in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4): 1542-6.
6. Berktaş M, Yaman G, Oztürk O. vanC gene-related intrinsic teicoplanin resistance detected in *Enterococcus casseliflavus* and *E.gallinarum* strains by the BD phoenix automated microbiology system. *J Clin Microbiol* 2008; 46(7): 2466.
7. Guidance for Industry and FDA. Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems. Document issued on: August 28, 2009. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071462.pdf>
8. Tenover F, Swenson J, O'Hara C, Stocker S. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 1995; 33(6): 1524-7.
9. Fahr A, Eigner U, Armbrust M, et al. Two-center collaborative evaluation of the performance of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41(3): 1135-42.
10. Carroll K, Glanz B, Borek A, et al. Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2006; 44(10): 3506-9.
11. Tasdelen Fisgin N, Darka O, Fisgin T, Hepsert S, Coban AY, Elli M. Surveillance study of vancomycin resistant enterococci in pediatric haematology and oncology patients. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40(3): 245-50.

12. Guducuoglu H, Aktas E, Begendik Comert F, et al. First isolation and detection of multiple clones of vancomycin-resistant enterococci in the pediatric unit of Van Yuzuncu Yil University Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(4): 535-43.
13. Nakipoglu Y, Gumus D, Sertel Selale D, Kucuker MA. In vitro susceptibility of *Enterococcus* strains to high level aminoglycosides and heavy metals. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(4): 545-51.
14. Malhotra-Kumar S, Haccuria K, Michiels M, et al; MOSAR WP2 Study Team. Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5): 1577-87.
15. Kainer M, Devasia R, Jones T, et al. Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(7): 1024-30.
16. Wade J. *Enterococcus faecium* in hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16(2): 113-9.
17. Kaçmaz B, Akça G, Sultan N. Enterokokların antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2004; 18(3): 287-92.