

# Bir Devlet Hastanesinde Vankomisine Dirençli Enterokok Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Olarak Değerlendirilmesi: İlk vanB-Pozitif *Enterococcus faecium* İzolatları\*

## Phenotypic and Genotypic Traits of Vancomycin-Resistant Enterococci in a Public Hospital: The First vanB-Positive *Enterococcus faecium* Isolates

Feride Alaca COŞKUN<sup>1</sup>, İpek MUMCUOĞLU<sup>1</sup>, Neriman AKSU<sup>1</sup>, Zeynep Ceren KARAHAN<sup>2</sup>,  
Ebru US<sup>2</sup>, Fazıl Alper TEKELİ<sup>2</sup>, İrmak BARAN<sup>1</sup>, Dilek KANYILMAZ<sup>3</sup>, Şenol KURŞUN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

<sup>1</sup> Ankara Numune Training and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

<sup>2</sup> Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

<sup>3</sup> Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Kontrol Komitesi, Ankara.

<sup>3</sup> Ankara Numune Training and Research Hospital, Infection Control Committee, Ankara, Turkey.

\* Bu çalışma 20. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi  
(10-13 Nisan 2010, Viyana, Avusturya)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 27.09.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 31.01.2012

### ÖZET

Hastanemizde, enfeksiyon kontrol programı çerçevesinde yürütülen sürveyans çalışmaları sırasında, bir yıllık dönemde 38 vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşu izole edilmiştir. Tüm suşlar VITEK2 (bioMérieux/Fransa) sistemi kullanılarak *Enterococcus faecium* olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testi sonucunda hem vankomisin hem de teikoplanine dirençli 30 suş vanA fenotipi olarak tanımlanırken, vankomisine dirençli, teikoplanine duyarlı sekiz suş vanB fenotipi olarak değerlendirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılarak 30 suşun vanA geni taşıdığı tespit edilirken, beş suşun vanB geni taşıdığı belirlenmiştir. Bu beş suş ülkemizde bildirilen ilk vanB pozitif *E. faecium* izolatlarıdır. "Pulsed field" jel elektroforezi (PFGE) ile yapılan değerlendirmede altı farklı bant paterni izlenmiş, altı suş ise sınıflandırılmamıştır. VanB tip direnç gösteren tüm suşların aynı grupta yer aldığı tespit edilmiştir. Bu suşların kaynağı hemodiyaliz ünitesi olarak belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında bu ça-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. İpek Mumcuoğlu, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Talatpaşa Bulvarı No: 5 Altındağ, Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 312 508 4000, E-posta (E-mail): ipekmmumcuoglu@hotmail.com

İşmada, ülkemizde *vanB* geninin *E.faecium* suşlarında ilk defa gösteriliyor olması, VRE izolasyon oranı kadar direnç çeşitliliğinin de artmakta olduğunu düşündürmektedir. Hastanelerde VRE yayılımının engellenmesi için etkili sürveyans çalışmalarının yapılması ve koruyucu önlemlerin alınması gereklidir.

**Anahtar sözcükler:** *Vankomisine dirençli enterokok; sürveyans; vanA; vanB; polimeraz zincir reaksiyonu; PCR; değişken alanlı jel elektroforezi; PFGE.*

## ABSTRACT

Thirty eight vancomycin resistant enterococci (VRE) were isolated in one year surveillance study for hospital infection control programme in a state hospital in Ankara, Turkey. All isolates were identified as *Enterococcus faecium* by VITEK2 system (bioMerieux, France). Vancomycin and teicoplanin resistant 30 strains were defined as vanA phenotype while vancomycin-resistant teicoplanin-susceptible eight strains were defined as vanB phenotype. *vanA* genes were found in 30 strains while *vanB* genes were found in five strains by using PCR method. Those five strains were the first *vanB* positive *E.faecium* strains in our country. VRE strains revealed six different band patterns by PFGE, while six isolates could not be classified. All isolates with *vanB* type resistance were found in the same cluster. Source of *vanB* positive strains was considered as the hemodialysis unit. When the previous national reports related to vancomycin-resistant enterococci were considered, this was the first report of *vanB* positive *E.faecium* isolates in our country. This emphasized that both the diversity of VRE and the isolation rate was increasing. In order to eliminate the spread of VRE, effective surveillance studies should be performed and protective measures should be established promptly.

**Key words:** *Vancomycin resistant enterococci; surveillance; vanA; vanB; polymerase chain reaction; PCR; pulsed field gel electrophoresis; PFGE.*

## GİRİŞ

Enterokoklar, 1970'li yıllara kadar patojen olmadığı kabul edilen, nadiren endokarditlerden sorumlu olarak bildirilen, gastrointestinal sistem normal florasının üyesidir<sup>1</sup>. Bu mikroorganizmaların virülansı düşük olmakla birlikte çoklu ilaç direnci geliştirme kapasiteleri yüksektir. Bu nedenle antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı kliniklerde ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler<sup>2</sup>. İlk vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşunun izolasyonundan sonra önemleri artmış, son 20 yıl boyunca dünyanın birçok bölgesinden VRE bildirilmiştir<sup>3</sup>. Ülkemizde ise 1998 yılında ilk izolasyonundan sonra pek çok hastane artan sayılarda VRE izolasyonu bildirmiştir<sup>4</sup>. Hastanemizde ve ülkemizde vankomisin direnci şu anda tehlikeli sınırlara ulaşmamasına rağmen, artan sayıda veriler glikopeptid direncinin yakın gelecekte bir problem olabileceğini düşündürmektedir.

Günümüze kadar glikopeptid direncinde VanA-E ve VanG olarak isimlendirilen altı fenotip tanımlanmış ve bunlardan VanA, VanB ve VanC en sık saptanan fenotipler olarak bildirilmiştir<sup>5</sup>. VanA fenotipindeki enterokok suşları, vankomisine [minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK): 64-> 1024 µg/ml] ve teikoplanine (MİK: 16-> 512 µg/ml)] yüksek düzeyde dirençli; VanB fenotipindeki izolatlar vankomisine değişik düzeylerde dirençli, teikoplanine duyarlıdır. Her iki fenotipte de direnç indüklenebilir ve diğer türlere aktarılabilir özelliindedir. VanC fenotipindeki izolatlar vankomisine kromozomal olarak düşük seviyelerde dirençli ve teikoplanine duyarlıdır. Bu direnç indüklenebilir ve aktarılamaz özelliindedir<sup>5</sup>.

Enterokokların çevresel kaynaklardan bulaşabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, risk faktörleri, direncin belirlenmesi, tarama prosedürleri ve kontrol önlemleri iyi bilinmelidir<sup>6</sup>. Enterokokların epidemiyolojik araştırmasında kullanılan bakteriyosin tiplendirme, faj tiplendirme, biyokimyasal reaksiyon profilleri, antimikrobiyal duyarlılıkları ve serolojik testler gibi klasik fenotiplendirme yöntemleri yetersizdir ve yararları sınırlıdır. Moleküler tiplendirme; dirençli enterokokların incelenmesi, önlenmesi ve yayılmalarının kontrol edilmesinde çok daha yardımcı bir yöntemdir<sup>6</sup>.

Bu çalışmada, hastanemizde enfeksiyon kontrol programı çerçevesinde yürütülen sürveyans çalışmaları sırasında izole edilen VRE suşlarının fenotipik ve genotipik yönden değerlendirilmesi ve ülkemizde ilk kez saptanan *vanB* direnç geni taşıyan *Enterococcus faecium* suşlarının sunulması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, bir yıl boyunca çeşitli kliniklerde yatan 520 hastadan tarama amacıyla alınan 777 rektal sürüntü örneği, 460 çevre örneği ve klinik izolatlar dahil edildi. Her hastanın aynı enfeksiyon bölgesinden elde edilen tek bir suş çalışmaya alındı. Her hasta için VRE ilk izolasyon tarihi, yaş, cinsiyet, klinik bulgular, hastanede kalış süresi, antibiyotik kullanımı, tanı, antibiyotik kullanımı, kateter varlığı, parenteral beslenme ve cerrahi bilgileri kaydedildi.

### Örneklerin Toplanması ve Ekimi

Rektal sürüntü örnekleri BBL Enterococcosel agara (BD, USA) ekildi ve 37°C'de aerop koşullarda 72 saate kadar inkübe edildi. Kliniklerden gelen örnekler kanlı ve EMB agara ekilerek 37°C'de 18-24 saat bekletildi. BBL Enterococcosel agarda üreyen siyah renkli koloniler ve klinik örneklerde üreyen şüpheli koloniler standart laboratuvar testleriyle ön incelemeleri yapıldıktan sonra VITEK2 otomatize sistemiyle (bioMérieux, Fransa) tanımlandı ve AST-534 kartlarıyla (bioMérieux, Fransa) antimikrobiyal duyarlılıkları araştırıldı. Vankomisin ve teikoplanin için MK değerleri "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle de belirlendi<sup>7</sup>. VRE olarak tanımlanan suşlar gliserollü buyyonda -86°C'de saklandı. VRE izolatlarının klonal analizlerinin yapılması için "pulsed field" jel elektroforezi (PFGE) kullanıldı. *vanA* ve *vanB* direnç genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle tespit edildi.

### PFGE

PFGE analizi Mulvey ve arkadaşlarının<sup>8</sup> geliştirdiği yöntemle uygulandı. *Sma*I ile kesilmiş DNA restriksiyon fragmanları 0.5XTBE tamponu içinde CHEF-DRII (Bio-Rad, ABD) cihazında atım süresi 5.3-34.9 saniye olmak üzere 6 V/cm olacak şekilde 14°C'de 20 saat elektroforeze tabi tutuldu. Jeller etidyum bromür (1 µg/ml) ile boyandı ve ultraviyole transilüminatör (TFX 20M, Vilber Lourmat, Fransa) altında görüntüledi. İzolatlar arasındaki genetik ilişki, jelde oluşan bant modelleri Tenover ve arkadaşlarının<sup>9</sup> tarif ettikleri kriterlere göre gözle incelenerek ve ayrıca Gene Directory bilgisayar programında (Syngene, İngiltere) Dice katsayısı, UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average) yöntemi ve %1 tolerans değeri kullanılarak dentogramlar oluşturulup değerlendirildi.

## PCR

Koyun kanlı agarda üretilen saf VRE kolonileri klasik fenol-kloroform yöntemiyle ekstrakte edildi<sup>10</sup>. *vanA* direnç geninin tespiti amacıyla *vanA1*, *vanA2* primerleri (5' GGGAAACGACAATTGC 3' ve 5' GTACAATGCGGCCGTTA 3', 732 bp) ve *vanB* direnç geninin tespiti amacıyla *vanB1*, *vanB2* primerleri (5' ATGGGAAGCCGATAGTC 3' ve 5' GATTCGTTCTCGACC 3', 635 bp) kullanılarak PCR uygulandı<sup>11</sup>. PCR ürünleri etidyum bromür (1 µg/ml) ile boyanmış %2'lik agaroz jele yüklendi ve 50 baz çifti (bç) moleküller standart (O'Range Ruler, Fermentas, Litvanya) kullanılarak 100 V'da bir saat yürütülerek ultraviyole transilüminatör (TFX 20M, Vilber Lourmat, Fransa) altında görüntüledi.

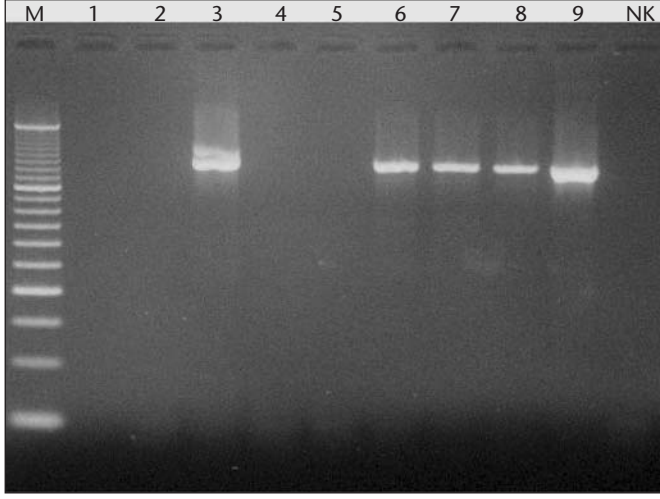
## BULGULAR

Bu çalışmaya, hastanemiz Enfeksiyon Kontrol Komitesinin yürüttüğü sürveyans çalışmaları kapsamında, başta yoğun bakım üniteleri olmak üzere, riskli ünitelerden alınan rektal sürüntü ve klinik örneklerden izole edilen VRE suşları alınmıştır. Otuz dört hastadan izole edilen 38 VRE izolatının 33'ü rektal sürüntü örneğinden, beşi klinik örneklerden (dört kan, bir idrar) elde edilmiştir. İki hastadan iki (kan ve rektal sürüntü) ve bir hastadan üç (idrar, kan ve rektal sürüntü) farklı klinik örnekten VRE izolasyonu yapılmıştır. Suşların çoğu, yoğun bakım ünitelerinde (%74) ve hematoloji kliniklerinde (%13) yatan hastalara aittir. Tüm izolatlar *E.faecium* olarak tanımlanmıştır. Çevre kültürlerinde VRE üremesi olmamıştır.

Hastaların 12 (%35.3)'si kadın, 22 (%64.7)'si erkek olup, yaş aralığı 23-89 (ortalama: 56.8) yıl, hastanede yatış süreleri ise 15-815 (ortalama 81.4) gündür. Hastaların %94 (32/34)'ünde antibiyotik ve/veya immünsüpresif ilaç kullanımı, %100 (34/34)'ünde santral kateter, enteral beslenme ve hemodiyaliz gibi invaziv girişim varlığı, %30.5 (12/34)'inde ise VRE tespiti öncesi operasyon geçirme öyküsü mevcuttur.

Antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre, tüm suşlar penisilin, ampisilin, ampisilin-sulbaktam, sefuroksim, imipenem ve eritromisine dirençli iken, 6 (%95) suş siprofloksasine, 33 (%87) suş yüksek düzey gentamisine, 31 (%82) suş yüksek düzey streptomisine, 17 (%45) suş tetrasikline ve 1 (%3) suş kinupristin-dalfopristine dirençli bulunmuştur. Tüm suşlar linezolide duyarlıdır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle tüm suşlar, MİK değerleri 128-512 µg/ml arasında değişmek üzere vankomisine dirençli olarak saptanmıştır. Teikoplanine ise 30 suşta 16-256 µg/ml arasında değişen direnç tespit edilirken, sekiz suşun ≤ 0.5-1 µg/ml değerleri arasında duyarlı olduğu belirlenmiştir. Hem vankomisin hem de teikoplanine dirençli 30 suş VanA fenotipi olarak kabul edilirken, vankomisine dirençli, teikoplanine duyarlı sekiz suş VanB fenotipi olarak belirlenmiştir.

VanA fenotipi gösteren 30 izolatın tamamında *vanA* geni tespit edilirken, VanB fenotipi gösteren sekiz suşun beşinde *vanB* geni tespit edilmiş; kalan üç suşta ise *vanA* veya *vanB* geni bulunamamıştır (Resim 1). Bu üç suştan ikisi, aynı hastaya ait idrar ve rektal sürüntü örneklerinden izole edilmiştir. Bu suşlarla yapılan çalışmalar tekrarlandığında, fenotipik vankomisin direncinin de ortadan kalktığı görülmüştür.

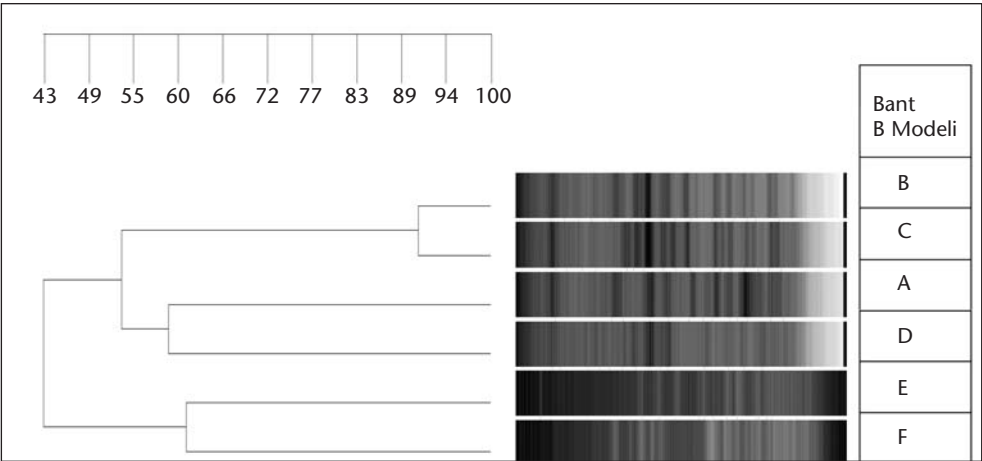


**Resim 1.** vanB genotipi saptanan suşların PCR görüntüsü [M: Moleküler standart (50 bç); Hat 1: Boş; Hat 2, 4 ve 5: vanA ve vanB geni saptanamayan suşlar; Hat 3, 6, 7, 8 ve 9: Sırasıyla 26, 30, 32, 33 ve 34 no'lu suşların DNA'larında vanB geni için özgül 635 bç büyüklüğünde amplifikasyon ürünü; NK: Negatif kontrol].

VRE suşları, *SmaI* enzimi ile yapılan kesim sonucunda 11-15 bant içeren altı farklı bant modeli (A-F) oluştururken, altı izolat sınıflandırılmamıştır (Şekil 1). A, B, C, D, E ve F band paternlerinde sırasıyla 8, 10, 3, 5, 3 ve 3 izolat yer almıştır. VanB fenotipi gösteren sekiz suşun tamamı A band grubunda yer almıştır.

## TARTIŞMA

VRE suşları, Türkiye'de ilk bildirildikleri 1998 yılından beri pek çok hastaneden artan sıklıkta rapor edilmektedir<sup>4,12-14</sup>. Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri'nde en sık



**Şekil 1.** VRE suşlarının *SmaI* restriksiyonu ile elde edilen PFGE bant modellerinin dendogramı.

VanA fenotipine rastlanmakta; ülkemizde bildirilen VRE izolatlarının ise, genellikle *vanA* geni taşıyan *E.faecium* suşları olduğu izlenmektedir<sup>12,13,15</sup>. Çalışmamızda tüm izolatlar *E.faecium* olarak tanımlanmış, VanA fenotipi gösteren 30 izolatın tamamında *vanA* geni tespit edilmiştir. VanB fenotipi gösteren sekiz suşun beşinde *vanB* geni tespit edilmiş, ancak bu suşların tamamının PFGE ile yapılan değerlendirmede aynı grupta yer aldıkları görülmüştür. Bu nedenle bu üç suşun da aslında *vanB* geni taşıdığı düşünülmüştür. Ancak stok suşlardan çalışmayı tekrarladığımızda bu suşlarda fenotipik direncin de kalktığı izlenmesi, dondurma-çözme işlemlerine *vanB* geninin daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu veri, yapılacak moleküler çalışmalarda kanımızca göz önüne alınması gereken bir bulgudur.

Ulaşılabildiği kadarıyla ülkemizde yapılan çalışmalar<sup>12,13,15</sup> incelendiğinde, bu çalışmanın, *vanB* geni taşıyan *E.faecium* suşlarının ilk defa bildirildiği bir araştırma olduğu görülmektedir. Bu durum, ülkemizde sadece VRE izolasyon oranını değil aynı zamanda direnç çeşitliliğinin de artmakta olduğunu vurgulamaktadır.

PFGE sonuçlarına göre aynı grup içinde yer alan ve VanB fenotipi gösteren sekiz suş incelenmiş ve farklı kliniklerde yatan hastalardan bir aylık süreç içinde tespit edildikleri belirlenmiştir. Hastaların yattıkları servislerden alınan çevre kültürlerinden VRE üretilmeyince, hastaların diğer ortak özellikleri araştırılmış ve bu gruptaki hastaların her hafta birkaç kere hemodiyaliz ünitesinden hizmet aldıkları tespit edilmiştir. Buna göre bulaşın bu ünitelerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Çevre kültürlerinde VRE üretememiş olmamız, bu enfeksiyonun dış ortamdaki bulaştığı gerçeğini ortadan kaldırmamaktadır. Sağlık çalışanları da kendilerini kolonize etmeksizin VRE suşlarını elleriyle taşıyabilirler. Bir diğer bulaş nedeni de, hastanemizin genellikle düşük sosyoekonomik koşullu nüfusa hizmet etmesi ve bu grubun kişisel hijyen bilincinin yüksek olmaması olabilir.

Sonuç olarak; ülkemizde bildirilen VRE kolonizasyon oranlarının artış eğiliminde olması, etkili sürveyans çalışmalarının gerekliliğini göstermekte; VRE suşlarının yayılımını engellemek için enfeksiyon kaynaklarının taranması ve uygun önlemlerin alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Winn WC Jr, Allen S, Janda W, et al. (eds). Streptococci, enterococci, and the streptococcus-like bacteria, pp: 673-764. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2006, 6<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
2. Murray BE. The life and times of the enterococcus. Clin Microbiol Rev 1990; 3(1): 46-65.
3. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1988; 1(8575-6):57-8.
4. Aktas Z, Diyarbakirli P, Bal C, et al. Investigation of phenotypic and genotypic characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. Mikrobiyol Bul 2007; 41(3): 347-56.
5. Malathum K, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. Drug Resist Updat 1999; 2(4): 224-43.
6. Teixeira LM, Siqueira-Carvalho MC, Facklam RR. Enterococcus, pp: 430-42. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, ASM Press, Washington DC.

7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20<sup>th</sup> Informational Supplement, 2010. CLSI, Wayne, PA.
8. Mulvey MR, Chui L, Ismail J, et al; Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3481-5.
9. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33(9): 2233-9.
10. Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E, Dolapci I, Akan OA. Investigation of Panton-Valentine leukocidin genes and SCCmec types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. Microb Drug Resist 2008; 14(3): 203-10.
11. 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(1): 24-7.
12. Comert FB, Kulah C, Aktas E, Ozlu N, Celebi G. First isolation of vancomycin-resistant enterococci and spread of a single clone in a university hospital in Northwestern Turkey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 26(1): 57-61.
13. Altun B, Cengiz AB, Kara A, Ceyhan M, Unal S, Seçmeer G. First vancomycin-resistant blood isolate of *Enterococcus faecium* in a children's hospital and molecular analysis of the mechanism of resistance. Turk J Pediatr 2008; 50(6): 554-8.
14. Kilic A, Baysallar M, Bahar G, Kucukaraaslan A, Cilli F, Doganci L. Evaluation of the EVIGENE VRE detection kit for detection of *vanA* and *vanB* genes in vancomycin-resistant enterococci. J Med Microbiol 2005; 54(Pt 4): 347-50.
15. Moellering RC Jr. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis 1998; 26(5): 1196-9.