

Klinik Enterokok İzolatlarının Tanımlanmasında Phoenix Otomatize Sistemi, API ID 32 Strep Sistemi ve LightCycler Enterococcus MGRADE Sisteminin Karşılaştırılması

Comparison of Phoenix Automated System, API ID 32 Strep System and LightCycler Enterococcus MGRADE System in the Identification of Clinical Enterococcus Isolates

Yeşim ÇEKİN¹, Betil ÖZHAK BAYSAN², Derya MUTLU², Nevgün SEPİN ÖZEN², Gözde ÖNGÜT², Levent DÖNMEZ³, Dilara ÖĞÜNÇ², Dilek ÇOLAK²

¹ Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Antalya.

¹ Antalya Education and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Antalya, Turkey.

² Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

² Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Antalya, Turkey.

³ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Antalya.

³ Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Public Health, Antalya, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 21.03.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.09.2012

ÖZET

İnsan gastrointestinal ve genitoüriner sistem florasında yer alan mikroorganizmalardan biri olan enterokoklar, hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli sebeplerinden biridir. Enterokokların tür düzeyinde tanımlanması, hastaların uygun tedavisi, enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik açıdan kritik öneme sahiptir. Ancak konvansiyonel yöntemlerle tür düzeyinde tanımlama zor ve zaman alan bir süreçtir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında saptanan enterokok izolatlarının tanısında konvansiyonel yöntemlerin yerini yarı otomatik veya otomatik tanımlama yöntemleri ve moleküler yöntemler almaktadır. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının tür düzeyinde tanımlanmasında, Phoenix otomatize sistemi (BD Diagnostic Systems, ABD), API Rapid ID 32 Strep sistemi (bioMerieux, Fransa) ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) kiti olan LightCycler Enterococcus MGRADE (Roche Molecular Biochemicals, Almanya) sisteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Her biri farklı hastaya ait klinik örnekten izole edilmiş 90 vankomisine duyarlı enterokok suşu, konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra her üç ticari yöntemle de tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntemle 90 izolatın 59'u *E.faecalis*, 28'i *E.faecium*, bi-

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Betil Özihak Baysan, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 07070 Antalya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 242 227 4343/44150, **E-posta (E-mail):** betilozhak@yahoo.com

ri *E. raffinosus*, biri *E. hirae*, biri *E. casseliflavus* olarak tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntemle *E. faecalis* olarak saptanan bir suş Phoenix sistemiyle *E. faecium* olarak, bir *E. faecium* suşu ise *E. durans* olarak tanımlanmıştır. Konvansiyonel yöntemle *E. raffinosus* olarak tanımlanan bir suş, API yöntemiyle *E. avium* olarak saptanmıştır. Konvansiyonel yöntemle *E. faecalis* olarak saptanan dört suş, Rt-PCR yöntemiyle *E. faecium* olarak; bir *E. faecium*, bir *E. raffinosus* ve bir *E. casseliflavus* suşu ise *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Buna göre; Phoenix, API Rapid ID 32 Strep ve LightCycler Enterococcus MGRADE sistemlerinin konvansiyonel tanımlama yöntemiyle uyumları sırasıyla; %97.8 (88/90), %98.9 (89/90) ve %92.2 (83/90) olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, çalışılan ticari yöntemlerden her üçünün de, klinik örneklerden izole edilen enterokokların tür düzeyinde tanımlanmasında konvansiyonel yöntemle yüksek düzeyde uyum göstermeleri ve aynı gün içinde sonuç verilebilme özelliklerinden dolayı, rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Enterococcus* türleri; tanımlama; konvansiyonel yöntem; Phoenix otomatize sistemi; API Rapid ID 32 Strep; gerçek zamanlı PCR.

ABSTRACT

Enterococci which are part of the commensal flora of the human gastrointestinal and genitourinary tracts, are increasing in importance as the cause of hospital-acquired infections. Identification of *Enterococcus* spp. at the species level is of great importance, for appropriate treatment of patients, infection control and to supply epidemiological data. Conventional methods for the identification of enterococcus isolates at species level is difficult and time consuming. Correct identification of enterococcus isolates in clinical microbiology laboratory by conventional methods is replaced by semi-automated or automated identification and molecular methods. The aim of this study was to evaluate the performance of Phoenix automated system (BD Diagnostic Systems, USA), API Rapid ID 32 Strep System (bioMérieux, France) and Enterococcus MGRADE LightCycler kit (Roche Molecular Biochemicals, Germany) used in real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR), for the species level identification of enterococcus strains isolated from clinical specimens. A total of 90 vancomycin susceptible enterococci isolated from different patients were identified by all of the three commercial systems, together with conventional methods. Of the strains, 59 were identified as *E. faecalis*, 28 were *E. faecium*, and one of each as *E. raffinosus*, *E. hirae* and *E. casseliflavus* with conventional methods. One *E. faecalis* strain identified by the conventional system was identified as *E. faecium* by Phoenix system and one *E. faecium* strain as *E. durans*. One *E. raffinosus* strain identified by the conventional method was identified as *E. avium* by API. Conventionally identified four *E. faecalis* strains were determined to be *E. faecium* by Rt-PCR and one *E. faecium*, one *E. raffinosus* and one *E. casseliflavus* as *E. faecalis*. Accordingly, the consistency of Phoenix, API Rapid ID 32 Strep and LightCycler Enterococcus MGRADE systems with the conventional methods were detected as 97.8% (88/90), 98.9% (89/90), and 92.2% (83/90), respectively. In conclusion, all of those three commercial assays are appropriate methods to be used for the identification of enterococci at the species level in the routine clinical microbiology laboratories, due to their high compliance with the conventional method, and their ability to yield the results at the same day.

Key words: *Enterococcus* species; identification; conventional methods; Phoenix automated system; API Rapid ID 32 Strep; real-time PCR.

GİRİŞ

Enterokok türleri çevre şartlarına dayanıklı olmaları, çeşitli antibiyotiklere yapısal direnç göstermeleri ve başta vankomisine karşı olmak üzere yeni direnç geliştirme özellikleri nedeniyle, son yıllarda hastane enfeksiyonlarının önemli nedenleri arasında yer al-

maktadır¹. Enterokok türleri, hastadan hastaya veya kolonize hastane personeli tarafından hastalara bulaştırılabilmekte ve böylece hastane içinde veya hastaneler arasında kolaylıkla yayılabilmektedir². Tüm klinik enterokok izolatlarının %80-90'ını *E.faecalis*, %8-15'ini ise *E.faecium* oluşturmaktadır³. Bu türlerde, vankomisin direnci *vanA*, *vanB*, *vanD* ve *vanE* genlerinin varlığı ile ilişkilidir. *vanA* ve *vanB* genleri, plazmid ve transpozonların bakteriler arasında transferi ile kazanılır. *E.gallinarum* ve *E.casseliflavus* suşlarında *vanC1* ve *vanC2* ligaz genleri ile kodlanan intrensek, transfer edilmeyen vankomisin direnci bulunmaktadır. Bu türler nadiren enfeksiyon oluşturur ve nadiren salgınlara yol açar. Bu nedenle enfeksiyon kontrol amaçlı ve kişiden kişiye bulaşın önlenmesi amacıyla özellikle *E.faecalis* ve *E.faecium* suşlarının diğer türlerden ayrılması önem taşımaktadır⁴.

Enterokok suşlarının fenotipik benzerlikleri nedeniyle tür düzeyinde tanımlanması zordur. Bakterinin fenotipik ve biyokimyasal özelliklerinin araştırıldığı konvansiyonel yöntemlerle tanımlama 2-7 gün sürmektedir⁵. Rutin laboratuvar çalışmalarında giderek artan sayıda hastane enfeksiyonu etkeni olarak karşılaşılan bu bakterinin tanısında zaman ve iş gücü kaybını azaltmak için konvansiyonel yöntemlerin yerini yarı otomatik veya otomatik tanımlama yöntemleri ve moleküler yöntemler almaktadır. Bu çalışmada, enterokok suşlarının tanısında kullanılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemi olan LightCycler Enterococcus MGRADE® kiti ile, API Rapid ID 32 Strep® ve Phoenix® otomatize sistemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümünde her biri farklı hastaya ait klinik örneklerden izole edilmiş, 90 vankomisine duyarlı enterokok izolatu çalışmaya alındı. Klinik izolatların koloni morfolojileri, Gram boyanma özellikleri, katalaz, L-pirolidonil-β-naftilamidi (PYP) enzimatik olarak hidrolize edebilme özellikleri test edildikten sonra, izolatlar farklı tanımlama yöntemleriyle çalışılmak üzere -70°C'de saklandı. Tekrar çalışmaya alınmadan önce iki kez %5'lik koyun kanlı Columbia agara (BD, ABD) pasajlandı. Kalite kontrol suşları olarak *E.faecalis* ATCC 29212 ve *E.faecalis* ATCC 51299 kullanıldı.

Koloni morfolojileri, Gram boyanma özellikleri, katalaz varlığı, %6.5 NaCl ve safra tuzları varlığında üreyebilme özellikleri, eskülin ve PYP'yi hidroliz etme özellikleri, tellürit varlığında üreyebilme, pigment oluşturma, arjinin hidrolizi, mannitol, sorboz, sukroz, rafinnoz, arabinoz, laktoz, sorbitol ve insülin şekerlerini fermente etme özellikleri, metil-alfa-D-glukopiranozid (MGP)'den asit oluşturma ve hareket özellikleri test edilerek enterokok cinsi ve türleri tanımlandı. Daha sonra *E.faecium* ve *E.faecalis* türlerine özgül primerler kullanılarak tür tanımı doğrulandı⁶.

Enterococcus spp. olduğu düşünülen koloniler Phoenix sistemi (BD Diagnostics, ABD) ve API Rapid ID 32 Strep (bioMérieux, Fransa) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı.

DNA ekstraksiyonu, daha önce tarif edildiği gibi yapıldı⁷. Ekstrakte edilen DNA 50 µl distile su ile süspanse edildikten sonra -20°C'de saklandı. LightCycler (version 1.0; Roc-

he Diagnostics, Almanya) cihazında Enterococcus MGRADE (Roche Molecular Biochemicals, Almanya) kiti ile 5 µl ekstrakte DNA kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı. Floresan rezonans enerji transferi (FRET) teknolojisinin kullanıldığı kitte hedef DNA dizileri "red 640" ile saptanırken, aynı zamanda PCR inhibitörü varlığı da farklı bir işaretleyici floresan (red 705) kullanılarak araştırıldı. Hibridizasyon prob teknolojisiyle çalışan bu kit, erime eğrisi analizi yaparak elde edilen erime derecelerine (Tm) göre *E.faecalis* ve *E.faecium* suşlarını tanımlarken, aynı zamanda *E.mundtii* ve *E.durans*/*E.hirae* türlerinin varlığını da tespit edebilmektedir. Buna göre, erime eğrisiyle elde edilen Tm dereceleri, üretici firmanın önerileri doğrultusunda *E.faecalis* için $58 \pm 2^\circ\text{C}$, *E.faecium* için $54 \pm 2^\circ\text{C}$, *E.durans* ve *E.mundtii* için $45 \pm 2^\circ\text{C}$ ve *E.hirae* için $43 \pm 2^\circ\text{C}$ olarak değerlendirildi.

Veri analizinde yöntemler karşılaştırılırken, verilerin kategorik olması nedeniyle yöntemlerin birbirleriyle uyumunun (agreement) belirlenmesi için tutarlılık (consistency) hesaplandı. Bu amaçla her iki yöntemin de aynı sonucu verdiği örnek sayısı, toplam çalışılan örnek sayısına bölündü.

BULGULAR

Konvansiyonel yöntemle çalışılan 90 izolatın 59'u *E.faecalis*, 28'i *E.faecium*, biri *E.raffinosis*, biri *E.hirae* ve biri *E.casseliflavus* olarak tanımlanmıştır (Tablo I). Enterokokların tür düzeyinde tanımlanmasında Phoenix sistemi, API Rapid ID 32 Strep ve Rt-PCR sistemleri ile konvansiyonel yöntem arasındaki uyum sırasıyla %97.8 (88/90), %98.9 (89/90) ve %92.2 (83/90) olarak bulunmuştur.

Phoenix sistemiyle konvansiyonel yöntem karşılaştırıldığında, iki örnekte uyumsuzluk saptanmıştır. Konvansiyonel yöntemle *E.faecalis* olarak saptanan bir suş, Phoenix sistemiyle *E.faecium* olarak, bir *E.faecium* suşu ise *E.durans* olarak saptanmıştır. API yöntemiyle konvansiyonel yöntem karşılaştırıldığında, bir örnekte uyumsuzluk saptanmıştır. Konvansiyonel yöntemle *E.raffinosis* olarak saptanan suş, API yöntemiyle *E.avium* olarak saptanmıştır. Gerçek zamanlı PCR yöntemiyle konvansiyonel yöntem karşılaştırıldığında, ye-

Tablo I. Enterokok Türlerinin Tanımlanmasında Phoenix (PNX) Otomatize Sistemi, API ID Sistemi ve LightCycler Enterococcus MGRADE Testinin Konvansiyonel Yöntemlerle Uymu*

Konvansiyonel tanımlama	İzolat sayısı	Uyumlu izolat sayısı		
		PNX n (%)	API n (%)	Rt-PCR n (%)
<i>E.faecalis</i>	59	58 (98.3)	59 (100)	55 (93.2)
<i>E.faecium</i>	28	27 (96.4)	28 (100)	27 (96.4)
<i>E.raffinosis</i>	1	1 (100)	-	-
<i>E.hirae</i>	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>E.casseliflavus</i>	1	1 (100)	1 (100)	-
Toplam	90	88 (97.8)	89 (98.9)	83 (92.2)

*Sonuçlar konvansiyonel yöntemler referans alınarak karşılaştırılmıştır. Her bir ticari yöntemin sonuçları konvansiyonel yöntemlere göre uyumlu ve uyumsuz olarak rapor edilmiştir.

di örnekte uyumsuzluk saptanmıştır. Konvansiyonel yöntemle *E.faecalis* olarak saptanan dört suş, Rt-PCR yöntemiyle *E.faecium* olarak, bir *E.faecium*, bir *E.raffinosis* ve bir *E.casseliflavus* suşu ise *E.faecalis* olarak tanımlanmıştır.

TARTIŞMA

Enterokokların tür düzeyinde tanımlanması hastaların uygun tedavisi, enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik açıdan kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda enterokokların tür düzeyinde tanımlanmasında klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için üretilmiş, Rt-PCR yöntemi (LightCycler *Enterococcus* MGRADE kiti) ile otomatize sistemlerin konvansiyonel yöntemle göre performansları değerlendirilmiştir. Otomatize sistemler iş yükünü azaltmaları ve kısa sürede sonuç verebilmeleri gibi avantajları nedeniyle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunun yanında sonuçların tekrarlanabilirliği, tür düzeyinde tanının yapılabilmesi, aynı anda antibiyotik değerlerinin verilebilmesi, kısa sürede sonuçların rapor edilmesi, epidemiyolojik verilere kolay ulaşılabilmesi ve maliyetin azaltılması gibi avantajlar, otomatize tanımlama ve duyarlılık saptama yöntemlerinin tercih edilmesine neden olmaktadır. Literatürde otomatize yöntemlerin hem ID hem de AST panellerinin güvenilirliğini test eden farklı yayınlar bulunmaktadır⁸⁻¹¹. Fahr ve arkadaşlarının⁸ yaptığı çalışmada Phoenix ve API ID sistemleri konvansiyonel yöntemlerle %98.9 uyum gösterirken, Donay ve arkadaşlarının⁹ yaptığı çalışmada bu oran %86.2 olarak saptanmıştır. Carroll ve arkadaşlarının¹⁰ 90 enterokok izolatını değerlendirdikleri çalışmada, Phoenix sistemi fenotipik yöntemlerle karşılaştırılmış ve aralarındaki uyum %100 olarak saptanmıştır. Fahr ve arkadaşları⁸, 179 enterokok izolatını Phoenix, API Rapid ID 32 Strep ve Vitek-2 sistemleriyle tanımlamış; API ID ve Vitek-2 ile *E.faecalis* olarak saptanan iki izolatın, Phoenix sistemiyle *E.casseliflavus*-*E.gallinorum* olarak saptandığını bildirmişlerdir. Brigante ve arkadaşlarının¹¹ yaptığı çalışmada, üç *E.faecalis* (3/25) suşu Phoenix sistemiyle *E.casseliflavus*-*E.gallinorum* olarak yanlış tanımlanmıştır. Aynı çalışmada dört *E.faecium* (4/36) suşunun ikisi Phoenix sistemiyle *E.casseliflavus*-*E.gallinorum* olarak, ikisi ise *E.durans* olarak tanımlanmıştır¹¹. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, türe özgül primerlerle *E.faecium* olarak tanımlanan bir suş, Phoenix sistemi ile iki kez çalışılmış ve her ikisinde de *E.durans* olarak tanımlanmıştır.

Chatzigeorgiou ve arkadaşlarının¹² gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin tanımlanmasında Phoenix ve Vitek-2 sistemlerini karşılaştırdıkları meta-analizde; enterokok suşlarının tür düzeyinde doğru tanımlanma oranı Phoenix sistemi için %96.9, Vitek-2 sistemi için %95.8 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda Phoenix sistemi ile enterokok suşlarının tür düzeyinde doğru tanımlanma oranı diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlarla benzer bulunmuştur. Buna karşın çalışmamızda, API Rapid ID 32 Strep sistemi ile enterokok suşlarının tür düzeyinde doğru tanımlanma oranı, diğer çalışmalarda bildirilen oranlara göre daha yüksektir. Bu durum, çalışmaya dahil edilen suşların çoğunun vankomisine duyarlı *E.faecium* ve *E.faecalis* türlerinden oluşmasından kaynaklanmış olabilir. Ancak, diğer çalışmaların aksine, Rt-PCR testinin konvansiyonel yöntemle uyumunun otomatize sistemlere göre nispeten daha düşük olduğu saptanmıştır^{6,7}. Sonuç olarak, enterokokların geleneksel fenotipik yöntemlerle tanımlanması, çok sayıda testin uygulanma-

sını gerektiren zahmetli ve uzun bir süreçtir. Çalışmamızda Phoenix Sistemi, API Rapid ID 32 Strep Sistemi ve LightCycler Enterococcus MGRADE testinin, klinik örneklerden izole edilen enterokokların tür düzeyinde tanımlanmasında konvansiyonel yöntemlerle yüksek düzeyde uyum gösterdikleri ve ek olarak aynı gün içinde sonuç verilebilme özelliklerinden dolayı enterokokların tanımlanmasında rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology 2009; 155(6): 1749-57.
2. Herwaldt LA, Wenzel RP. Dynamics of hospital-acquired infection; pp: 169-81. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. ASM Press, Washington DC.
3. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn WC (eds). The gram-positive cocci: Part II: Streptococci, Enterococci, and the "Streptococcus-like" bacteria, pp: 674-745. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2006, 6th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
4. Chen DK, Pearce L, McGeer A, Low DE, Willey BM. Evaluation of D-xylose and 1% methyl-alpha-D-glucopyranoside fermentation tests for distinguishing *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol 2000; 38(10): 3652-5.
5. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989; 27(4): 731-4.
6. Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Ozenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(11): 3073-7.
7. Eisner A, Gorkiewicz G, Feierl G, et al. Identification of glycopeptide-resistant enterococci by VITEK 2 system and conventional and real-time polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 53(1): 17-21.
8. Fahr AM, 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.
9. Donay JL, 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.
10. Carroll KC, Borek AP, Burger C, et al. Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of staphylococci and enterococci. J Clin Microbiol 2006; 44(6): 2072-7.
11. Brigante G, Luzzaro F, Bettaccini A, et al. Use of the Phoenix automated system for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* spp. J Clin Microbiol 2006; 44(9): 3263-7.
12. Chatzigeorgiou KS, Sergeantanis TN, Tsiodras S, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Phoenix 100 versus Vitek 2 in the identification of gram-positive and gram-negative bacteria: a comprehensive meta-analysis. J Clin Microbiol 2011; 49(9): 3284-91.