

Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde İzole Edilen İlk Metronidazole Dirençli *Bacteroides* Kökeni: *Bacteroides thetaiotaomicron**

The First Metronidazole-Resistant *Bacteroides* Species Isolated at Marmara University Hospital: *Bacteroides thetaiotaomicron*

Nurver TOPRAK ÜLGER¹, Elvan SAYIN¹, Faysal DANE², Güner SÖYLETİR¹

¹ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Marmara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

² Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Marmara University Faculty of Medicine, Department of Medical Oncology, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (3-7 Kasım 2012, Kuşadası, Aydın)'nde sunulmuş ve The American Society for Microbiology en iyi poster ödülüne layık görülmüştür.

Geliş Tarihi (Received): 08.03.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.05.2013

ÖZET

İnsan bağırsak mikrobiyotasının önemli bir kısmını oluşturan *Bacteroides* türleri, ağır batın içi enfeksiyonları, cerrahi yara enfeksiyonları ve bakteriyemiye neden olabilirler. Ayrıca bu bakteriler, diğer anaerob bakterilere göre antibiyotiklere daha fazla dirençlidirler. Karbapenemler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri ve nitroimidazol gibi sınırlı sayıda antibiyotikler *Bacteroides* türlerinin eliminasyonunda etkilidirler. Ancak son zamanlarda bazı ülkelerde nadiren de olsa nitroimidazollere dirençli *Bacteroides* kökenleri bildirilmiştir. Metronidazole direnç mekanizmasının çoğunda *nim* genleri (*nim* A-G) suçlanmaktadır. Bu raporda, kan kültüründen izole edilen metronidazole dirençli bir *Bacteroides thetaiotaomicron* kökeni bildirilmektedir. Pankreas başı adenokarsinomu tanısı alan 62 yaşındaki erkek hastanın cerrahi girişim sonrası 5. günde, kan kültüründen gram-negatif zorunlu anaerob bir çomak izole edilmiştir. Geleneksel testler ve ticari biyokimyasal kitler kullanılarak köken, *B. thetaiotaomicron* olarak tanımlanmıştır. İzolatın antimikrobiyal duyarlılık paterni agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Direnç genleri, *nim* genine özgül primer çiftleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır. Safılaştırılan PCR ürünü dizilenmiş ve GenBank'da bulunan dizilerle karşılaştırılarak analizi yapılmıştır. Metronidazolün MİK değeri 16 mg/L olarak tespit edilmiştir. Köken CLSI kriterlerine göre ara değerde (intermediate) olmakla beraber, EUCAST kriterlerine göre dirençli (> 4 mg/L) bulunmuştur. Bakteride *nim* geni saptanmış; yapılan dizi analizinde, PCR ürününün *nimE* geni (emb|AM042593.1) ile %100 benzer olduğu görülmüştür. Diğer

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Nurver Toprak Ülger, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa Kampüsü, İstanbul, Türkiye. Tel (Phone): +90 216 414 4732, E-posta (E-mail): nurverulger@yahoo.com

yandan izolat, karbapenemlere ve sulbaktam-ampisiline duyarlı bulunmuştur. Sulbaktam-ampisilin ile tedavi edilen hastanın ateşi 24 saat sonra düşmüştür. Klinik durumunda kayda değer bir düzelmeye olan hasta 8. günde taburcu edilmiştir. Operasyon sonrası altı ay süreyle onkoloji polikliniğinde takip edilen hasta, hastalığın progresi nedeniyle kaybedilmiştir. Anaerob bakterilere bağlı bakteriyemilerde mortalite oranının yüksek olması nedeniyle, tanının hızlı yapılması ve uygun tedavinin verilmesi hayati önem taşır. Çalışmalar, *Bacteroides* türlerine bağlı bakteriyemilerde, hastaya, bakterinin duyarlı olmadığı antibiyotiklerin verilmesi halinde olumsuz sonuçların alınacağını göstermiştir. Bu olguda, metronidazole dirençli mikroorganizma, CLSI breakpoint değerlerine göre duyarlı bildirilebilir, buna bağlı olarak da klinik yanıtızlık görülebilirdi. Dolayısıyla *Bacteroides* türleri için antibiyotik duyarlılık sonuçlarının, EUCAST MİK değerleriyle yorumlanması daha akılcı gözükmektedir.

Anahtar sözcükler: *Bacteroides thetaiotaomicron*; metronidazole; direnç; nim geni, Türkiye.

ABSTRACT

Bacteroides species, the predominant constituents of the human intestinal microbiota can cause serious intraabdominal and postoperative wound infections and bacteremia. Moreover, these bacteria are more resistant to antimicrobial agents than the other anaerobes. The limited number of the antimicrobials, such as carbapenems, beta-lactam/beta-lactamase inhibitors and nitroimidazoles are highly effective in eliminating *Bacteroides*. However, a few metronidazole-resistant isolates have been reported from several countries recently. The *nim* genes (*nim A-G*) are suggested to be responsible for the majority of the metronidazole resistance. Here, we describe a metronidazole-resistant *Bacteroides thetaiotaomicron* isolated from a blood culture. A gram-negative obligate anaerobic rod was isolated from the postoperative 5th day blood culture of a 62-year-old male patient with adenocarcinoma of the pancreas head. The strain was identified as *B.thetaiotaomicron* by using a combination of conventional tests and commercially available biochemical kits. Antimicrobial susceptibility testing was performed by agar dilution method. The resistance genes were investigated by means of PCR using specific primer pairs for *nim* gene. The purified PCR product was sequenced and analyzed by comparison of the consensus sequences with GenBank sequences. The MIC for metronidazole was 16 mg/L. Although the strain was intermediate according to the CLSI criteria, it was resistant (> 4 mg/L) according to EUCAST criteria. The isolate was *nim* gene positive, and nucleotide sequencing of the PCR product shared 100% similarity with *nimE* gene (emb|AM042593.1|). On the other hand the isolate was susceptible to carbapenems and sulbactam-ampicillin. Following administration of ampicillin-sulbactam, the patient's fever disappeared after 24 hours. The clinical condition improved considerably and he was discharged at day 8. The patient was followed up at the medical oncology clinic; however he died due to disease progression six months after surgery. Since anaerobic bacteremia is associated with high mortality rate, prompt diagnosis and proper management are critical. The studies on *Bacteroides* bacteremia have revealed adverse outcomes in patients receiving antibiotics to which the bacterium was resistant. In the present case, the metronidazole-resistant organism would be reported as susceptible according to CLSI breakpoint value and on account of this result the treatment might lead to clinical failure. Therefore EUCAST MIC values seem to be more rational in case of *Bacteroides* antibiotic susceptibility testing.

Key words: *Bacteroides thetaiotaomicron*; metronidazole; resistance; *nim* gene; Turkey.

GİRİŞ

Bağırsak mikrobiyotasının önemli bir kısmını oluşturan *Bacteroides* türleri, kanser varlığı, cerrahi girişim veya yaralanma gibi mukoza bütünlüğünün bozulduğu durumlarda invazif enfeksiyonlara neden olabilirler. Anaerob enfeksiyonlarda en sık izole edilen en-

dojen patojenler olan bu bakteriler, çoğunlukla batın içi apseleri veya bakteriyemi gibi yaşamı tehdit eden ölümcül enfeksiyonlara yol açabilirler¹. *Bacteroides* türlerinin bir diğer önemli özelliği, antibiyotiklere diğer anaeroplara göre daha fazla direnç göstermeleridir. Son yıllarda klindamisin ve beta-laktam gibi anaeroplara etki eden antibiyotiklere karşı giderek artan oranda direnç bildirilmiştir. Bu bakteriler karbapenemler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri ve nitroimidazol gibi sınırlı sayıda antibiyotiklere duyarlıdır². Ancak son zamanlarda bazı ülkelerde nadiren de olsa nitroimidazollere dirençli kökenler rapor edilmiştir²⁻⁵.

Bu raporda, pankreas başı tümörü ön tanısı ile opere edilen hastanın kan kültüründen üretilen, metronidazole dirençli bir *Bacteroides* izolatı; *Bacteroides thetaiotaomicron* kökeni tartışılmaktadır.

OLGU SUNUMU

Pankreas başı tümörü ön tanısı ile operasyona alınan 62 yaşındaki erkek hastanın, operasyon sonrası 5. günde vücut sıcaklığı 38°C'ye yükselmiştir. Hastadan kan örnekleri alınmış, aerop ve anaerop kan kültür şişelerine ekilerek laboratuvarımıza gönderilmiştir. Pozitif sinyal veren anaerop kültür şişesinden çikolata, McConkey ve bir tanesi anaerop ortamda inkübe edilmek üzere iki adet koyun kanlı ağara ekim yapılmıştır. Anaerop ortamda inkübe edilen kanlı ağarda 48 saat sonra orta büyüklükte, gri renkli mukoid kolonilerin oluştuğu gözlenmiş, aerop ortamda inkübe edilen besiyerlerinde ise üreme olmamıştır. Koloniden hazırlanan preparatlarda gram-negatif basiller görülmüştür. İzolat, geleneksel yöntemler, yarı otomotize (Rapid ID 32A, BioMerieux, Fransa) ve otomotize sistemler (MALDI-TOF, VITEK-MS) kullanılarak *B.thetaiotaomicron* olarak tanımlanmıştır. Aerop kan kültür şişesinde, bir haftalık inkübasyon süresince herhangi bir üreme gerçekleşmemiştir.

Bakterinin, ampisilin, sulbaktam-ampisilin, meropenem, imipenem, klindamisin ve metronidazol antibiyotiklerine duyarlılığı agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Metronidazol MİK değeri 16 mg/L olarak saptanmış, bunun üzerine metronidazol direnç geni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılmıştır⁶. Direnç genlerinin saptanması için, bakteri DNA'sı izole edilmiş, NIM3-F (5'ATG TTC AGA GAA ATG CGG CGT AAG CG-3') ve NIM5-R (5'- GCT TCC TTG CCT GTC ATG TGC TC-3') primerleri kullanılarak PCR ile *nim* geni amplifiye edilmiştir⁷. Döngüler, 95°C'de 2 dakika, 32 döngü (94°C'de 45 saniye, 42°C'de 45 saniye, 72°C'de 1 dakika) ve 72°C'de 10 dakika olarak uygulanmıştır⁷. Negatif kontrol olarak ATCC 25285 *B.fragilis*, pozitif kontrol olarak *B.fragilis nimA*, *nimB*, *nimC*, *nimD* ve *nimE* genine sahip beş köken (Prof. Dr. Elizabeth Nagy, Szeged Üniversitesi, Klinik Mikrobiyoloji Enstitüsü, Macaristan'dan temin edilmiştir) kullanılmıştır.

Çalışılan kökenin metronidazol MİK değeri 16 mg/L'dir. Metronidazol "MİK 16 mg/L" değeri CLSI kriterlerine göre ara değerde (intermediate), EUCAST kriterlerine göre ise dirençli (> 4 mg/L) grubunda yer almaktadır^{5,6}. Kökenin, diğer antibiyotiklerden ampisilin ve klindamisine dirençli, ancak ampisilin-sulbaktam ve karbapenemlere duyarlı olduğu gösterilmiştir. PCR ile çoğaltılan *nim* geni REFGEN (Ankara, Türkiye) tarafından dizilen-

miş; elde edilen veri Gen Bankası verileriyle karşılaştırılmış ve *nimE* geni (emb-IAM042593.1I) ile %100 oranında benzer olduğu görülmüştür⁸.

TARTIŞMA

Farklı ülkelerden bildirilen metronidazole dirençli *Bacteroides* türlerinin oranı %1'in altındadır^{3,5}. Ülkemizde sınırlı sayıda yapılmış çalışma bulunmaktadır. Direnç oranı Mamal Torun ve arkadaşlarının⁹ verilerine göre %4, Erciş ve arkadaşlarının¹⁰ yaptığı çalışmada ise %14 bulunmuştur. Hastanemizde ilk kez metronidazole dirençli bir *Bacteroides* türü; *B.thetaiotaomicron* kökeni izole edilmiş, bu çalışmada bakterinin fenotipik ve genotipik özellikleri araştırılmıştır.

Metronidazol, 5'nitroimidazol türevleri içinde en fazla kullanılan antibiyotiktir¹¹. Anaerop koşullarda nitro grubunun indirgenmesiyle aktif forma geçen metronidazol, bakteri DNA'sına bağlanarak, baz dizilerini, dolayısıyla çift sarmal yapıyı bozar, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu engeller. Metronidazole direnç, sıklıkla indirgeme işlevi gören nitroredüktaz enzim aktivitesinin azalması veya hücre içine antibiyotiğin girişinin engellenmesiyle gerçekleşmektedir. Bu iki mekanizmanın beraber bulunduğu anlaşılmıştır. Antibiyotiğin aktif pompa ile dışarı atılması veya DNA'nın hızla yenilenmesinin de ilaca direncin gelişmesine yol açabileceği öne sürülmektedir^{2,7,10}.

Metronidazole dirençli kökenlerde, direncin diğer bakterilere geçişini sağlayan yedi *nim* (*nimA-G*) geni tanımlanmıştır. Bu *nim* genlerinin kodladıkları redüktaz enzimlerinin, nitroimidazollerini toksik olmayan ürünlere dönüştürdükleri anlaşılmıştır¹². Sayıları fazla olmamakla beraber *nim* genleri ülkelere göre farklı dağılım göstermektedir. Fas ve Güney Arabistan'da *nimB*, İngiltere'de *nimA*, İtalya'da *nimA* ve *nimC* varlığı saptanmış, *nimE* ise Kuveyt ve Macaristan'dan bildirilmiştir¹³. Tanımlanan bu *nim* genlerinden, bir kısmı bakteri kromozomunda yer almakta, bir kısmı ise plazmid üzerinde hareketli DNA parçalarında bulunmaktadır. Hareketli DNA yapıları, direncin bir bakteriden diğerine kolayca aktarılmasına olanak sağlamaktadır¹⁴. Bu durum ileride metronidazole dirençli *Bacteroides* sayısında artışların olabileceği kaygısını yaratmaktadır. Tehlikeyi önlemek veya oluşacak direnci kontrol altında tutabilmek için bakterilerin antibiyotik direnç paternini belirli aralıklarla saptamak ve dirençten sorumlu genlerin durumunu yakından izlemek gerekmektedir¹⁵. Periyodik olarak hastanemiz laboratuvarında, izole edilen *Bacteroides* kökenlerinin antibiyotiklere direnç durumları CLSI'nın önerdiği agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmekte ve direnç genleri araştırılmaktadır. Kan ve beyin omurilik sıvısı gibi önemli örneklerden bakterinin izole edilmesi halinde ise klinisyene hızlı bilgi vermek amacıyla E-test yöntemiyle duyarlılık testleri yapılmaktadır.

Olgumuzda, damar yoluyla gidecek şekilde, günde 1 g ampisilin-sulbaktam tedavisi başlanmış, hastanın ertesi gün ateşi düşmüştür. Genel durumunda kayda değer bir düzelme saptanan hasta, operasyon sonrası 8. günde taburcu edilmiştir. Hastanın patoloji raporu T3N1 pankreas invazif duktal adenokarsinomu olarak sonuçlanmıştır. Operasyonun ardından altı ay süreyle hastanemiz onkoloji polikliniğinde takip edilen hasta, hastalığın progresyonu nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Ancak gerek anaeroplara bağlı bak-

teriyemide laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz uygulama sayesinde, gerekse klinisyen ve laboratuvar arasında kurulan iyi iletişimin bir sonucu olarak, hastada enfeksiyonun tedavisinin başarılı olduğu kanısındayız. Sunulan bu olguda, ampicilin-sulbaktam tedavisine yanıt alınmıştır. Oysa, "CLSI kriterlerine göre dirençli sayılmayan, ancak direnç taşıyan bakterinin elimine edilmesinde antibiyotik olarak metronidazol kullanılmış olsaydı klinik yanıtızlık gelişebilirdi" düşüncesindeyiz. Bu durumda *Bacteroides* türleri için antibiyotik duyarlılık sonuçlarının, EUCAST MİK değerleriyle yorumlanması daha akılcı gözükmetedir.

KAYNAKLAR

1. Finegold SM. Anaerobic bacteria: General concepts, pp: 2519-75. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Hecht DW. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. Clin Infect Dis 2004; 39(1): 92-7.
3. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, et al. Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009. Anaerobe 2011; 17(4): 147-51.
4. Sherwood JE, Fraser S, Citron DM, et al. Multi-drug resistant *Bacteroides fragilis* recovered from blood and severe leg wounds caused by an improvised explosive device (IED) in Afghanistan. Anaerobe 2011; 17(4): 152-5.
5. Nagy E, Urbán E, Nord CE; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. Clin Microbiol Infect 2011; 17(3): 371-9.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard, M11-A7. 2007, 7th ed. CLSI, Wayne, PA.
7. Trinh S, Reyssat G. Detection by PCR of the nim genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. J Clin Microbiol 1996; 34(9): 2078-84.
8. Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J. GenBank. Nucleic Acids Res 1997; 25(1): 1-6.
9. Mamal Torun M, Bahar H, Yüksel P. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Bacteroides fragilis* grubu bakterilerin antimikrobiklere direnç durumları ve beta-laktamaz aktiviteleri. ANKEM 2000; 14(1): 104-10.
10. Erci S, Tunçkanat F, Haşçelik G. Klinik örneklerden izole edilen anaerob gram-negatif basillerin çeşitli antibiyotiklere direnç durumları. XXXI Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 19-23 Eylül 2004, Kuşadası, Aydın. Kongre Kitabı, Poster No: 036.
11. Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. Clin Infect Dis 2010; 50(Suppl 1): S16-23.
12. Stubbs SL, Brazier JS, Talbot PR, Duerden BI. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of *Bacteroides* spp. and characterization of nitroimidazole resistance genes. J Clin Microbiol 2000; 38(9): 3209-13.
13. Söki J, Eitel Z, Urbán E, Nagy E; ESCMID Study Group on Anaerobic Infections. Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. Int J Antimicrob Agents 2013; 41(2): 122-5.
14. Söki J, Gal M, Brazier JS, et al. Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains. J Antimicrob Chemother 2006; 57(2): 212-20.
15. Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, et al. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. Clin Infect Dis 2000; 30(6): 870-6.