

Balık kökenli *Enterococcus faecalis* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri

Serap SAVAŞAN¹, Osman KAYA¹, Şükrü KIRKAN¹, Alper ÇİFTÇİ²

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın; ² Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

Özet: İnsan ve hayvanlarda komensal olarak bulunan enterokoklar, belirli koşullarda hastalıklara neden olabilirler. Kültür balıkçılığının gelişmesi ve artması ile balıklarda diğer bakteriyel infeksiyonlarla birlikte enterokokal infeksiyonlar da büyük bir problem olmaya başlamışlardır. Enterokoklar, doğadaki geniş dağılımları, yüksek düzeyde antibiyotik dirençlilikleri ve neden oldukları infeksiyonlardaki yüksek mortaliteleri ile ilgi çeken mikroorganizmalardır. Bu çalışmada, balıklardan izole edilen Enterokokların vankomisin ve diğer antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmamızda Ege Bölgesinde hasta ve ölü balıklardan izole edilen 26 *Enterococcus faecalis* suşu kullanıldı. *E. faecalis* suşlarının siprofloksasin, eritromisin, tetrasiklin, streptomisin, ampisilin, gentamisin, penisilin ve vankomisin duyarlılıkları agar-disk difüzyon tekniği ile incelendi. Vankomisin dirençli enterokokların (VRE) vankomisin direnç fenotipleri agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi. İncelenen *E. faecalis* suşları, siprofloksasin, eritromisin, tetrasiklin, streptomisin, ampisilin, gentamisin, penisilin ve vankomisine sırasıyla %34.6, %3.8, %3.8, %96.1, %11.5, %92.3, %11.5 ve %3.8 oranında dirençli bulundu. İncelenen 26 suştan 1'inin (%3.8) vankomisine dirençli olduğu saptandı. Bu suşun vankomisin direnç fenotipinin vanA olduğu belirlendi. Bu bulgular, balıklarda streptomisin, gentamisin ve siprofloksasine dirençli suşların yaygın olarak bulunduğunu; düşük oranda da olsa vankomisine dirençli suş bulunması, balıkların VRE kaynağı olarak dikkate alınması gerektiğini gösterdi.

Anahtar sözcükler: Antibiyotik dirençlilik, balık, *Enterococcus faecalis*, vankomisin

Antimicrobial resistance in *Enterococcus faecalis* from fishes

Summary: Enterococci, which are found as commensal in animals and human, can cause infections in definite conditions. The improvement and increment of aquaculture cause to happen a big problem for not only the other bacterial infections but also enterococcal infections in fishes. Enterococci are interesting microorganisms owing the wide range of distribution in nature, high level of antimicrobial resistance, and high mortality rates in enterococcal infections. The aim of this study was to determine the resistance to vancomycin and other antimicrobials in fish isolates of enterococci. Twenty six *Enterococcus faecalis* strains which were isolated in sick and dead fishes were used in study. Ciprofloxacin, erythromycin, tetracycline, streptomycin, ampicillin, gentamicin, penicillin, and vancomycin susceptibility of *E. faecalis* strains were examined with agar disc diffusion techniques. The vancomycin resistance phenotype of vancomycin resistant enterococci (VRE) was determined by agar dilution method. Ciprofloxacin, erythromycin, tetracycline, streptomycin, ampicillin, gentamicin, penicillin and vancomycin resistance of *E. faecalis* strains were found as 34.6%, 3.8%, 3.8%, 96.1%, 11.5%, 92.3%, 11.5%, and 3.8%, respectively. One of the 26 *E. faecalis* strains (3.8%) was found as vancomycin resistant (VRE) and the vancomycin resistance phenotype of this strain was determined as VanA. These findings showed that ciprofloxacin, streptomycin and gentamicin resistant *E. faecalis* strains were prevalent in fishes. Despite of the low proportion, the presence of a vancomycin resistant *E. faecalis* strain suggested that fishes must be considered as VRE source.

Key words: Antimicrobial resistance, *Enterococcus faecalis*, fish, vancomycin.

Giriş

Enterokoklar geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler. Çeşitli hayvanların ve insanların gastrointestinal kanalında, ağızda, genital ve üriner sisteminde ve derisi üzerinde bulunabilirler (4,16). Canlı organizmalar dışında, yüzey sularından, akarsulardan, lağım sularından, topraktan ve çeşitli besin maddelerinden enterokok izolasyonu yapılmıştır (10,13). Veteriner hekimlik alanında enterokoklar üzerindeki ilgi son yıllara kadar, insan hekimliğine göre daha az olmuştur. Bunda, salgın

veya epidemilere neden olmamaları, hayvanların nosokomial infeksiyonlara nisbeten daha dirençli olmaları rol oynamaktadır. Ancak, insanlarda enterokokların öneminin anlaşılması ve özellikle vankomisin dirençli enterokokların bulaşmasında hayvanların rolü ortaya çıktıktan sonra bazı araştırmalar yapılmıştır. Bunun sonucunda, çeşitli hayvanların sporadik infeksiyonlarından, özellikle küçük hayvanların veya ev hayvanlarının nosokomial infeksiyonlarından enterokoklar izole edilmeye başlanmıştır (5,17). Ayrıca, *Enterococcus*

seriolicida tatlı su balıklarında septisemik infeksiyona neden olmaktadır (17). Günümüzde bakteriyel balık patojenlerinin epizootiyolojisi hakkında bilgi çok azdır. Balıklarda bulaşmanın direkt temasla ya da kontamine balık yemleriyle olabileceği düşünülmektedir (17).

Enterokokların yol açtıkları infeksiyonların ciddi boyutlara ulaşmasının, ölüm oranının yüksek olmasının ve dolayısıyla üzerlerinde gittikçe artan ilginin en önemli nedeni antibiyotik dirençlilikleridir (8,18,19). Enterokoklar klinik mikrobiyolojide antibiyotik dirençliliğinin en çok izlendiği mikroorganizmaların başında gelmektedir. Bazı vakalarda, enterokok suşunun çoğul dirençliliği nedeniyle hiç bir tedavi seçeneği kalmamaktadır. Enterokok suşları, ampisilin ve sefalosporin gibi β -laktamlara, düşük konsantrasyondaki aminoglikozidlere, klindamisine, florokinolonlara ve trimethoprime intrinsik olarak dirençlidirler (3,12). Glikopeptid yapısındaki antimikrobiyal maddelerden olan vankomisin, diğer antibiyotiklere dirençli enterokok suşlarından ileri gelen ciddi infeksiyonlarda başvurulacak son tedavi seçeneğidir. Ancak enterokoklarda gittikçe artan vankomisin dirençliliği nedeniyle antimikrobiyal tedavi başarısız olmakta ve bu da infeksiyonlardaki yüksek ölüm oranının başlıca nedenlerinden birisi olarak gösterilmektedir (8,11). Fenotipik özelliklerine göre VanA, VanB, VanC, VanD ve VanE olmak üzere 5 tip vankomisin dirençliliği tanımlanmıştır (3). Bu fenotipler vankomisin ve teikoplaninin belirli MIC sınırları içine giren suşları kapsamaktadır (11).

Son yıllarda dünyanın farklı yerlerinden sporadik ve epidemik balık hastalıklarına neden olan gram pozitif koklar rapor edilmiştir. Kültür balıkçılığının gelişmesi ve artması ile birlikte balıklarda diğer bakteriyel infeksiyonlarla birlikte enterokokkal infeksiyonlarda dünya çapında büyük bir problem olmaya başlamışlardır (2,7,9). Enterokokkosis, hemorajik septisemi ile karakterizedir. Tipik klinik belirtiler ise, bilateral eksoftalmi, operkulumda ve kaudal yüzgeç kan damarlarında görülen peteşilerdir (1).

Ülkemizde Ege bölgesinde hem yurt içine hemde yurt dışına yönelik üretim yapan işletmeler bulunmaktadır. Her geçen gün artan kültür balıkçılığında, büyük ekonomik kayıplara neden olan hastalıklar gündeme gelmektedir. Bu araştırmada, bölgedeki işletmelerden temin edilen balıklardan izole edilen Enterokok suşlarının vankomisine ve bazı antibiyotiklere karşı dirençlilik durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Enterokok suşları

Çalışmada, Ege bölgesinde canlı ve ölü balıklardan izole edilen 26 *E.faecalis* suşu kullanıldı. Suşlar kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

Besiyerleri ve antibiyotik diskleri

Suşların üretilmesinde ve pasajlarında Brain-Heart Infusion (BHI) agar (Difco), BHI buyyon, antibiyotik duyarlılık testlerinde Mueller-Hinton agar (Difco), suşların saklanması için Nutrient Broth No.2 (Oxoid) kullanıldı. Disk difüzyon testinde, vankomisin (30 μ g), streptomisin (10 μ g), tetrasiklin (30 μ g), siprofloksasin (5 μ g), eritromisin (15 μ g), ampisilin (10 μ g), penisilin (10 μ g), gentamisin (10 μ g) diskleri kullanıldı.

Antibiyotik duyarlılık testleri

Balıklardan izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile incelendi. Disk difüzyon testinde, incelenen suşların BHI buyyondaki 24 saatlik kültürlerinden 0.1 ml alınarak Mueller-Hinton agara cam bagetle yayıldı ve üzerine antibiyotik diskleri yerleştirildi. Besiyerleri oda ısısında 30 dakika süreyle difüzyona bırakıldıktan sonra, 37°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, diskler çevresindeki inhibisyon zonları ölçülerek, disk difüzyon testi standartlarına göre değerlendirme yapıldı. Buna göre, vankomisin için 9 mm ve altı dirençli, 12mm ve üstü duyarlı; streptomisin için, 11 mm ve altı dirençli, 15 mm ve üstü duyarlı; tetrasiklin için, 14 mm ve altı dirençli, 19 mm ve üstü duyarlı; siprofloksasin için, 15 mm ve altı dirençli, 21 mm ve üstü duyarlı; eritromisin için, 13 mm ve altı dirençli, 23 mm ve üstü duyarlı, ampisilin için 16mm ve altı dirençli, 17 mm ve üstü duyarlı, penisilin için 14mm ve altı dirençli, 15 mm ve üstü duyarlı, gentamisin için 12 mm ve altı dirençli, 15 mm ve üstü duyarlı, 13-14 mm intermedier olarak değerlendirildi.

Vankomisin direnç fenotipinin belirlenmesi

Vankomisinin ve teikoplaninin distile su içinde iki katlı sulandırmaları yapıldı. Bu dilasyonlardan 0.1 ml alınarak, son konsantrasyonları vankomisin için 0.5-1024 μ g/ml ve teikoplanin için 0.25-128 μ g/ml olacak şekilde 50°C'de bekletilen Mueller-Hinton agarın 10 ml'sine katıldı. Besiyeri petri kutularına döküldükten sonra oda ısısında 2 saat bekletildi. İncelenen suşların BHI buyyondaki 18 saatlik kültürlerinden Mueller-Hinton agara nokta şeklinde ekimler yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, üremeler incelendi. Üreme görülmeyen son antibiyotik dilasyonu MIC olarak belirlendi. Bu testte vankomisin MIC \geq 64 μ g/ml, teikoplanin MIC \geq 2 μ g/ml bulunan suşlar VanA fenotipi olarak değerlendirildi (3).

Bulgular

Balıklardan izole edilen 26 enterokok suşunun antibiyotiklere duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. İncelenen *E.faecalis* suşları, siprofloksasin,

eritromisin, tetrasiklin, streptomisin, ampisilin, gentamisin, penisilin, vankomisin'e sırasıyla %34.6, %3.8, %3.8, %96.1, %11.5, %92.3, %11.5, %3.8 oranında dirençli bulundu (Tablo). Eritromisin ile yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde intermedier zon veren suşların çokluğu dikkat çekti. Çoklu antibiyotik direnci bakımından suşların %42.3'ü üç, %3.8'i yedi antibiyotiğe dirençli bulundu.

İncelenen 26 suştan 1'inin (%3.8) vankomisine dirençli olduğu saptandı. Bu suşun direnç fenotipi Vankomisin MIC 512(µg/ml) ve Teikoplanin MIC 8(µg/ml) değerlerine göre VanA olarak belirlendi. Bu suş ayrıca, ampisilin dışında incelenen tüm antibiyotiklere dirençli bulundu.

Tablo. Balık kökenli 26 *E. faecalis* suşunun antibiyotik duyarlılık profilleri.

Tablo. Antimicrobial susceptibility patterns of 26 *E. faecalis* strains from fish.

Suşlar	Antibiyotik duyarlılık							
	Vankomisin	Siprofloksasin	Streptomisin	Tetrasiklin	Eritromisin	Penisilin	Ampisilin	Gentamisin
<i>E. faecalis</i> 1	S	İ	R	S	İ	S	R	R
<i>E. faecalis</i> 2	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 3	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 4	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 5	S	R	R	S	İ	R	S	R
<i>E. faecalis</i> 6	S	R	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 7	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 8	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 9	S	R	R	İ	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 10	S	İ	R	S	İ	S	R	R
<i>E. faecalis</i> 11	R	R	R	R	R	R	S	R
<i>E. faecalis</i> 12	S	R	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 13	S	R	R	İ	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 14	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 15	S	R	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 16	S	İ	S	S	İ	S	S	I
<i>E. faecalis</i> 17	S	İ	R	S	İ	S	S	I
<i>E. faecalis</i> 18	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 19	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 20	S	R	R	S	İ	S	S	I
<i>E. faecalis</i> 21	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 22	S	İ	R	S	İ	S	R	R
<i>E. faecalis</i> 23	S	R	R	İ	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 24	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 25	S	İ	R	S	İ	S	S	R
<i>E. faecalis</i> 26	S	İ	R	S	İ	R	S	R

R, dirençli; S, duyarlı; İ, intermedier zon

Tartışma ve Sonuç

Günümüzde balık yetiştiriciliği önemli bir sektör haline gelmiştir. Son yıllarda balık hastalıklarında görülen sporadik ve epidemik infeksiyonların önemli bir kısmının Gram pozitif koklardan kaynaklandığı saptanmıştır. Yapılan taksonomik çalışmalarda balık hastalıklarına neden olan farklı Gram pozitif kok türleri bulunduğu belirtilmiştir. Bu türlere örnek olarak *Streptococcus iniae*, *S. difficile*, *Lactococcus piscium*, *Vagococcus salmoninarum* ve *Enterococcus seriolicida* verilmiştir (6). Balık orjinli streptokok ya da enterokokların özelliklerini gösteren Gram pozitif koklar arasında oldukça yüksek düzeyde fenotipik heterojenite bulunmuştur. Eldar ve ark. (7), alabalıklardan fenotipik ve serolojik özelliklerine göre *Enterococcus* türleri izole etmişlerdir. Enterokoklarla infekte balıklarda septisemi ve ölümler görüldüğü bildirilmiştir (2).

Enterokokların en ilgi çeken karakterlerinden birisi, çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdikleri yüksek orandaki dirençlilikleridir. Bu fenomen aynı zamanda, klinik enterokok infeksiyonlarındaki yüksek mortalitenin nedenlerinden birisi olarak gösterilmektedir (3). Bu çalışmada, balıklardan izole edilen *Enterokok* suşlarının antibiyotik direnç özellikleri belirlendi.

Çalışmada kullanılan streptomisin, siprofloksasin, tetrasiklin, eritromisin, ampisilin, gentamisin, penisilin ve vankomisin gibi antibiyotiklerden en az birine dirençli enterokok türü veya türleri mutlaka bulundu. Tüm enterokok suşlarının en çok dirençlilik gösterdiği antibiyotikler ise streptomisin, gentamisin ve siprofloksasin oldu. Tetrasiklin, eritromisin ve vankomisine dirençlilik nisbeten daha düşük oranda bulundu. Ayrıca, eritromisin ile yapılan testlerde intermedier zon veren suşların fazlalığı, bu antibiyotik için öngörülen intermedier zon çapının oldukça geniş olmasına bağlandı. Peterson ve ark. yaptıkları çalışmada *E. faecalis*'in streptomisine yüksek düzeyde dirençli olduğunu belirtmişlerdir (15). Thal ve ark. çeşitli hayvanlardan izole ettikleri enterokokların, özellikle de *E. faecium* suşlarının ampisilin, streptomisin ve gentamisine tek veya çoklu şekilde dirençli olduklarını bildirmişlerdir (19). Ayrıca Tayland'da yapılan bir çalışmada balık orijinli enterokok suşları (*E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*) karşılaştırıldığında en yüksek eritromisin ve oksitetrasiklin direnci *E. faecium*da bulunmuştur (14). Balık orijinli suşların, antibiyotiklere dirençliliğini sistematik şekilde araştırarak başka çalışma bulunmadığı için daha detaylı karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır.

Diğer antibiyotiklerin dışında, vankomisin dirençliliğinin enterokoklar için özel bir yeri vardır. Çünkü, çoğul dirençli enterokok suşlarından ileri gelen infeksiyonlarda vankomisin son tedavi seçeneğidir. Çalışmamızda vankomisine dirençli tek suş VanA

fenotipinde yer aldı. *E. faecalis* belirtilen fenotipin ana taşıyıcısı olarak bilindiğinden (3), elde edilen bulgular temel bilgilere uyumlu bulundu.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular ve sınırlı sayıda da olsa literatür bilgisi, antibiyotik dirençliliğinin balık enterokok suşlarında da varolduğunu göstermektedir. Bu bulgular balıklarda streptomisin, gentamisin ve siprofloksasine dirençli suşların yaygın olarak bulunduğunu ve düşük oranda da olsa vankomisine dirençli suş bulunması, balıkların VRE kaynağı olarak dikkate alınması gerektiğini gösterdi.

Kaynaklar

1. **Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH** (1999): *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. 304-305. In: Fish Diseases and Disorders, R, Kusuda, F, Salati (Ed), CAB International, Oxfordshire.
2. **Cheng W, Chen JC** (1998): *Isolation and Characterization of an Enterococcus-like bacterium causing muscle necrosis and mortality in Makrobranchium rosenbergii in Taiwan*. Dis Aquat Organ, **34**, 93-101.
3. **Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG** (2000): *Vancomycin-resistant enterococci*. Clin Microbiol Rev, **13**, 686-707.
4. **Devriese L A, Cruz-Colque JI, DE Herdt P, Haesebrouck F** (1992): *Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats*. J Appl Bacteriol, **73**, 421-425.
5. **Devriese LA, Hommez J, Leavens H, POT B, Vandamme P, Haesebrouck F** (1999): *Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows*. Vet Microbiol, **70**, 87-94.
6. **Eldar A, Ghittino C, Asanta L, Bozzetta E, Gorla M, Prearo M, Bercovier H** (1996): *Enterococcus seriolicida is a junior synonym of Lactococcus garviae, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish*. Curr Microbiol, **32**, 85-88.
7. **Eldar A, Gorla M, Ghittino C, Zlotkin A, Bercovier H** (1999): *Biodiversity of Lactococcus garviae strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia*. Appl Environ Microbiol, **65**, 1005-1008.
8. **Endtz HP, Van Den Braak N, Verbrugh HA, Van Belkum A** (1999): *Vancomycin resistance: status quo and quo vadis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, **18**, 683-690.
9. **Frick IM, Morgelin M, Bjorck L** (2000): *Virulent aggregates of Streptococcus pyogenes are generated by homophilic protein-protein interactions*. Mol Microbiol, **37**, 1232-1247.
10. **Harwood VJ, Brownell M, Perusek W, Whitlock JE** (2001): *Vancomycin-resistant Enterococcus spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States*. Appl Environ Microbiol, **67**, 4930-4933.
11. **Malathum K, Murray BE** (1999): *Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options*. Drug Resist Updates, **2**, 224-243.
12. **Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M** (2000): *Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance*. Clin Microbiol Rev, **13**, 513-522.
13. **Pinto B, Pierotti R, Canale G, Reali D** (1999): *Characterization of faecal streptococci as indicators of faecal pollution and distribution in the environment*. Lett Appl Microbiol, **29**, 258-263.
14. **Peterson A, Dalsgaard A** (2002): *Species composition and antimicrobial resistance genes of Enterococcus spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand*. Environ Microbiol, **5**, 395-402.
15. **Peterson A, Andersen JS, Kaewmak T, Somsiri T, Dalsgaard A** (2002): *Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment*. Appl Environ Microbiol **68**, 6036-6042.
16. **Quednau M, Ahrne S, Petersson AC, Molin G** (1998): *Antibiotic resistant strains of Enterococcus isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork*. J Appl Microbiol, **84**, 1163-1170.
17. **Romalde JL, Magarinos B, Nunez S, Barja JL, Toranzo A E** (1996): *Host range susceptibility of Enterococcus sp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection*. Appl Environ Microbiol, **62**, 607-611.
18. **Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JAA, The European VRE Study Group** (1999): *Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe*. Antimicrob Agent Chemother, **43**, 2542-2546.
19. **Thal LA, Chow JW, Mahayni R, Bonilla HB, Perri MB, Donabedian SA, Silverman J, Taber S, Zervos MJ** (1995): *Characterization of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin*. Antimicrob Agent Chemother, **39**, 2112-2115.

Geliş tarihi: 28.09.2007 / Kabul tarihi: 01.10.2007

Yazışma adresi

Yrd. Doç. Dr. Serap Savaşan
Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 09020 Aydın
e-mail: ssavas@adu.edu.tr