

**TOPLUM KAYNAKLI METİSİLİN'E DUYARLI VE DİRENÇLİ  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ KİNOLON  
DUYARLILIKLARININ İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ\***

**INVITRO QUINOLONE SUSCEPTIBILITY OF COMMUNITY ISOLATES OF  
METHICILLIN SUSCEPTIBLE AND RESISTANT  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS**

**Pınar ZARAKOLU\*\* , Engin GÜVENER\*\***

**Özet:** S.aureus'un antibiyotik direncinin; toplum ve hastane suşları arasında farklılıklar gösterebileceği ifade edilmektedir. Hastane içi ve dışı metisilin'e dirençli S.aureus'ların (MRSA) sahip oldukları çoklu direnç nedeniyle çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmaktadır. Çalışmamızda, toplum kaynaklı klinik materyallerden izole edilen 41 metisilin'e duyarlı S.aureus (MSSA) ve 34 MRSA suşunun mikrodilüsyon yöntemiyle kinolonlara (siprofloksasin, ofloksasin, norfloksasin, enoksasin, pefloksasin) duyarlılığı test edildi. Mikrodilüsyon yöntemiyle MIC tayinleri NCCLS'in önerdiği şekilde yapıldı. Tüm MRSA ve MSSA suşlarının kinolon'lara duyarlı olduğu saptandı. Her iki grubun kinolon'lara duyarlılık yüzdeleri arasında uygulanan t testi sonucu istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ( $p > 0.01$ ). MSSA'larda diğer dört kinolon enoksasin'e göre invitro olarak daha etkin bulundu. MRSA'larda siprofloksasin ve ofloksasin invitro olarak daha etkindi.

**Summary:** It is suggested that the antibiotic resistance of S.aureus in hospital and community isolates shows difference. Investigators are testing the susceptibility of community and nosocomial S.aureus isolates against different kinds of antibiotics because of their multiple resistance. In this study, we tested invitro quinolone (ciproflaxacin, ofloxacin, norfloxacin, enoxacin, pefloxacin) susceptibility of community isolates of 41 methicillin susceptible S.aureus (MSSA) and 34 methicillin resistant S.aureus (MRSA) by microdilution method. MIC values were determined according to the method recommended by NCCLS. All the isolates of MRSA and MSSA were found susceptible

\* XXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresinde sunulmuştur (11-15 Nisan 1994, Antalya).

\*\* Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara.

against quinolones. We observed that there wasn't a significant difference between the quinolone susceptibility percentages of the two groups with the t test statistically ( $p > 0.01$ ). The other four quinolones were invitro more potent than enoxacin to MSSA. Ciprofloxacin and ofloxacin were found more potent to MRSA invitro.

## GİRİŞ

*Staphylococcus aureus* (S.aureus)'un hem metisilin direnci hem de diğer antibiyotiklere duyarlılıkları açısından hastane suşları ile toplum suşları arasında farklılıklar olabileceği düşünülmektedir (1).

Çalışmamızdaki amaç, toplum suşları olarak izole ettiğimiz MRSA ve MSSA'larda kinolon grubu antibiyotik duyarlılığının mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerinin tayinidir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

1993 yılında poliklinik olgularından izole edilen toplum kaynaklı 75 adet S.aureus suşu üzerinde çalışıldı. Bu suşların, poliklinik olgularından izole edilen toplum kaynaklı suşlar olmasına dikkat edildi. S.aureus olarak tanımlanan suşlar, metisilin direnci yönünden araştırıldı. Bunun için standart Müller-Hinton agarda oksasiline'in 1µg'lık diskleri (Difco) kullanılarak standart disk difüzyon yöntemi uygulandı. 35 °C'de 24-48 saat inkübasyon sonrasında zon çapları değerlendirildi (NCCLS Document M2-A4). Oksasiline diskleri saklama sırasında daha stabil olması nedeniyle metisiline'e tercih edildi (2). 11 mm'den küçük zon çapı gösteren suşlar dirençli, 11-12 mm intermediate, 13 mm duyarlı olarak değerlendirildi. Bu çalışmalardan sonra MSSA ve MRSA suşlarının kinolon duyarlılığı mikrodilüsyon yöntemi ile saptandı. Bu yöntemde besiyeri olarak Cation Supplemented MH broth (CSMHB) kullanıldı.

İstenen konsantrasyon 1280 µg/ml, hacim 10 ml olacak şekilde, potensini bildiğimiz antibiyotigin ölçülecek ağırlığı saptandı. Bazı ajanlar için çözücü olarak NaOH, dilüent olarak tümü için deiyonize su kullanıldı. Bu şekilde hazırlanan stok solüsyonlar -20 °C'de en fazla 30 gün bekletildi. Kullanılacağı zaman sıvı besiyeri ile 1/5'lik dilüsyonu hazırlandı (3, 4).

İnokulumun hazırlanması: Kanlı plakta 24 saat inkübasyona bırakılan taze kültürden alınan koloniler, MHB'a inoküle edildi. MacFarland 0.5'e ayarlandı. Dilüe edilerek  $1 \times 10^6$  cfu/ml'ye ulaşıldı.

Mikropleytlerin hazırlanması: Steril U, V veya yassı tabanlı mikropleytlar kullanıldı. Steril uç takılan 50 µl (0.05 ml) lik pipetlerle tüm çukurlara MHB kondu. Her sıranın ilk çukuruna 0.05 ml. denenecek antimikrobiyal solüsyonun 1/5 oranında dilüe edilmiş solüsyonu konuldu. İlk çukur böylece 256 µl/ml oldu. İki katı katlanan dilüsyonları yapıldı. İnokulumun ilavesiyle antibiyotik konsantrasyonları 64'ten 0.03'e ayarlandı. İnokulum son konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  halini aldı. Bu şekilde hazırlanan mikropleytlar 35 °C'de 24-48 saat inkübe edildi.

Her bir antimikrobiyal ajan için kullanılan bir sırada, gözle görülebilir şekilde organizmanın üremesini engelleyen en düşük konsantrasyon, o mikroorganizma için o antimikrobiyal ajanın MIC değeri olarak kabul edildi. Bu değerlendirme MIC 90 olarak ifade edilmektedir. Bariz bir üreme, bulanıklık şeklinde gözlenmektedir. Özellikle Gram pozitif koklarda, üreme granüller olabilmektedir. İki mm'den büyük tek bir mikro koloni ya da herhangi büyüklükte birkaç partikül üreme olarak değerlendirilmiştir (4). Standart suş olarak kullanılan S.aureus ATCC 29213 ile kalite kontrolü yapılmıştır.

### B U L G U L A R

Bu çalışmada, 41 adet MSSA ve 34 adet MRSA suşu ile çalışıldı. Bu suşlar, toplum kaynaklı klinik materyallerden izole edilmiş olup, suşların birbirine oranını ifade etmemektedir.

Değerlendirmede kullanılan MIC breakpoint değerleri Tablo 1'de sunulmuştur. Bu değerler, NCCLS M2-A4 1991 kaynaklıdır.

Tablo 1

#### Kinolonların MIC Breakpoint Değerleri

	Dirençli	Duyarlı
Siprofloksasin	≥4	≤1
Ofloksasin	≥8	≤2
Enoksasin	≥8	≤2
Norfloksasin	≥16	≤4
Perfloksasin	≥8	≤4

Bir antimikrobiyal ajanın breakpoint değeri, optimal terapi ile serumda ulaşılabilen konsantrasyon değeridir. Breakpoint değerinde veya altında MIC değerine sahip olan organizmalar duyarlı sayılırlar (5). Laboratuvarında saptanan MIC değeri sıklıkla antimikrobiyalin kanda ulaşılabilen konsantrasyonu ile bağlantılıdır (4, 5). Bir dilüsyonluk hata payı MIC testinin doğruluk sınırları içinde değerlendirilir. Antibakteriyellerin etkinliklerinin saptanmasında kullanılan MIC 50 değeri, incelenen bakteri popülasyonunun % 50'sini inhibe eden, MIC 90 değeri ise % 90'nını inhibe eden konsantrasyon değerleridir. Standart kemoterapötik'in MIC'i ile, incelenmekte olan kemoterapötik'in MIC'i karşılaştırılarak antibiyotik'in bu suş üzerindeki etkinliği hakkında yargıya varılır (6). Bu çalışmanın verileri, Tablo 2 ve 3'de sunulmuştur.

Tablo 2

#### 41 Adet MSSA Suşunun Kinolonlara Duyarlılığı

	MIC-Sınırları	MIC-50	MIC-90	Duyarlık Yüzdesi	
MSSA n=41	Siprofloksasin	4-0.03	0.06	0.5	38/41 (% 92)
	Ofloksasin	8-0.03	0.12	2	37/41 (% 90)
	Enoksasin	32-0.03	0.25	4	36/41 (% 88)
	Norfloksasin	16-0.03	0.25	2	39/41 (% 95)
	Pefloksasin	32-0.03	0.12	2	39/41 (% 95)

Tablo 3  
34 Adet MRSA Suşunun Kinolonlara Duyarlılığı

		MIC-Smırları	MIC-50	MIC-90	Duyarlık Yüzdesi
MSSA n=37	Siprofloksasin	16-0.03	0.12	2	28/34 (% 82)
	Ofloksasin	16-0.03	0.12	4	26/34 (% 76)
	Enoksasin	64-0.03	0.25	16	24/34 (% 71)
	Norfloksasin	64-0.03	0.5	16	28/34 (% 82)
	Pefloksasin	32-0.03	0.25	16	26/34 (% 76)

### T A R T I Ş M A

MRSA'ların çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdikleri çoklu direnç nedeniyle birçok antimikrobiyal ajana ve klinik kullanıma son yıllarda girmiş olan kinolonlara karşı duyarlılıkları sıkça araştırma konusu olmaktadır (7, 8).

S.aureus'ların kinolonlara karşı duyarlılıklarını araştırmak için çeşitli araştırmalar incelenmiştir. Paton ve arkadaşlarının çalışmasında; S.aureus'a karşı, siprofloksasin ve ofloksasin'in aynı aktiviteye sahip olduğu; pefloksasin, norfloksasin ve enoksasin'in sırasıyla onları takip ettikleri belirtilmektedir. Stafilokoklar, kinolonlara karşı orta duyarlılıkta sayılmıştır (9). Lebel ve arkadaşları, siprofloksasin, ofloksasin ve pefloksasin'in MRSA'lar dahil tüm S.aureus'larda iyi aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (10).

Ülkemizde; S.aureus kinolon duyarlılığına yönelik yapılan çalışmalarda saptanan duyarlılık yüzdelerinin birbirine yakın olduğu gözlenmektedir. Çetin ve arkadaşları 1988 yılında, S.aureus'ların ofloksasin duyarlılığını % 89 olarak saptamışlardır (11). 1989'da yapılan iki ayrı çalışmada, S.aureus'un ofloksasin duyarlılığı yine % 89 olarak tespit edilmiştir (12, 13). 1991'de Koşan ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucu, ofloksasin ve pefloksasin'e duyarlılık % 91, siprofloksasin'e duyarlılık % 87 şeklindedir (14). Yine 1991'de toplum kaynaklı S.aureus suşlarının siprofloksasin duyarlılığı % 100 olarak saptanmıştır (15).

MRSA'ların kinolon duyarlılığı ayrıca ele alındığında, çeşitli araştırmalardan farklı sonuçlar elde edilmektedir. Mapple ve arkadaşları, klinik kullanıma yeni girmiş bir antibiyotik olarak siprofloksasin direncini yaygın bulduklarını belirtmişlerdir (7). Smith ve arkadaşları, % 98 oranında florokinolonlara duyarlı buldukları MRSA suşlarında, hızla gelişen bir dirençten söz etmektedirler (16). Mapple ve arkadaşları başka bir çalışmalarında, MRSA'larda siprofloksasin, ofloksasin ve pefloksasin'i eşit etkinlikte bulurken, enoksasin ve norfloksasin'i daha az etkin bulmuşlardır (17). Ülkemizde, Akalın ve arkadaşları yeni gelişmekte olan kinolonları invitro olarak metisiline dirençli stafilokoklara çok etkili bulmuşlardır. Ofloksasin % 100, siprofloksasin % 97, pefloksasin % 90 etkili bulunmuştur (18). Sultan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, MRSA'lar siprofloksasin'e % 92, ofloksasin'e % 89 oranında duyarlı bulunmuştur (19).

Bizim çalışmamızda, MSSA'larda kinolonlara duyarlılık yüzdeleri, pefloksasin ve norfloksasin % 95, siprofloksasin ve ofloksasin % 92, enoksasin % 88 şeklindedir. MRSA'larda ise, siprofloksasin ve norfloksasin'e % 82, pefloksasin ve ofloksasin'e % 76, enoksasin'e % 71 oranındadır.

Bir antibiyotiğin belli bir türe karşı etkinliğinden söz edebilmek için, suşların en az % 50'sinin, enfeksiyon bölgesindeki veya kandaki ortalama konsantrasyondan düşük MIC değerlerine sahip olması gerekmektedir (20). Buna göre, çalışılan MRSA ve MSSA tüm suşlar, kinolonlara duyarlı bulunmuştur. Ayrıca her kinolona karşı duyarlı bulunan MSSA ve MRSA suşlarının oranları iki yüzde arasındaki farkın önemlilik testi (t testi) ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak da farkın anlamlı olmadığı gözlenmiştir ( $p > 0.01$ ).

Çalışmamızı, MIC 90 sonuçlarına göre değerlendirdiğimizde, MSSA'larda siprofloksasin'in 0.5 µgr/ml ile en potent inhibitör etkiye sahip olduğunu; ofloksasin, pefloksasin ve norfloksasin'in 2 µgr/ml ile takip ettiğini; enoksasin'in 4 µgr/ml ile geride kaldığını gözlemiş bulunuyoruz (Tablo 2) MRSA'larda yine MIC 90 sonuçlarına göre, siprofloksasin ve ofloksasin diğerlerinden sırasıyla 8 ve 4 kat daha potent olarak saptanmıştır (Tablo 3). Buna göre; çalışmamızda MRSA'lar dahil S.aureus'larda kinolonların gösterdiği potens çeşitli yayınlardaki bulgularla (9, 10, 17) uyumlu görülmektedir. Siprofloksasin toplum kaynaklı S.aureus'ların metisilin dirençli ve duyarlı suşlarında en potent kinolon olarak saptanmıştır.

Çalışmamız sonucunda toplum suşu olarak izole edilen S.aureus'ların kinolon duyarlılığı, hastane suşu olarak izole edilenlerden farklı bulunmamıştır. Bu durumun daha geniş serilerle irdelenmesi gerekmektedir. Öte yandan ülkemizde, S.aureus'larda gözlenen kinolon direncinde, klinik kullanıma girdiklerinden bu yana bir artma izlenmemektedir. MSSA'larda kinolon duyarlılığı % 90'ların üstündedir. MRSA'larda tedavide ilk seçenek olan vanokimisin ile kıyaslandığında daha az toksik olmaları ve toplum kaynaklı metisiline dirençli suşların izole edildiği olgularda vankomisin yerine ayaktan tedavi olanağı sağlamaları ile klinisyenler için bir seçenek oluşturabileceği düşünülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Anđ Ö: Stafilokoklarda antibiyotik direnci. Klimik derg, 1989, 2(3): 87-90.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standarts: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standart M7-A2. NCCLS, Villanova, PA 1990.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standarts: Solvents and diluents for preparation of stock solutions of antimicrobial agents requiring solvents other than water, 1991, 11(7).
4. Tilton RC, Howard BC: Antimicrobial susceptibility testing, p.121-153. In Carson D. (ed), Clinical and Pathogenic Microbiology, 1987. The C.V. Mosby Company. St Louis. Washington DC. Toronto.
5. Finegold SM, Baron EJ: Micrococcaceae, p.323-332. In Carson D. (ed), Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 1990, 8<sup>th</sup> edition. The C.V. Mosby Company. St. Louis. Toronto. Baltimore. Philadelphia.

6. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard M2-A4. NCCLS, Villanova, PA 1990.
7. Mapple PAC, Hamilton Miller JMT, Brumfitt W: World-wide antibiotic resistance in MRSA. *Lancet*, 1989, i: 537-540.
8. Walker RC, Wright AJ: The Fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc*, 1991, 66: 1249-1259.
9. Paton JH, Reeves DS: Fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc* 66: 1988, 1249-1259.
10. LeBel M, Ciprofloksasin. *Pharmacotherapy*, 1988, 8: 3-33.
11. Çetin ET, Gürler N, Sarpel C, Töreci K: Muayene maddelerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının kemoterapötiklere duyarlılığı. *Ankem derg.*, 1988, 2: 105.
12. Emektaş G, Kocabeyoğlu Ö, Sonuvar S: Stafilokokların kemoterapötik duyarlılıkları. *Ankem derg.*, 1989, 3: 187.
13. Gürler N, Sarpel C, Töreci K, Çetin ET: Muayene maddelerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının kemoterapötik maddelere duyarlılıkları, *KÜKEM Derg.*, 1989, 12: 9.
14. Koşan E, Kocabeyoğlu Ö, Keskin K, Öztürkeri H: Klinik örneklerden izole edilen çeşitli bakteri suşlarında kinolon direnci. *Ankem Derg.*, 1991, 5: 108.
15. Benzonana NA, Akgül A, Dündar V, Bilgin S, Mansur T, Selçuk S: Toplumdan kazanılmış cilt enfeksiyonlarından izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının oksasiline ve diğer antibiyotiklere direnci. *Ankem Derg.*, 1991, 5: 161.
16. Smith KR, Cobbs CG: Invitro activity of Sparfloksasin and three other Fluoroquinolones against MRSA and MRSE. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis*, 1992, 11: 55-58.
17. Mapple PAC, Hamilton Miller JMT, Brumfitt W: Differing activities of Quinolones aagainst Ciprofloxacin susceptible and resistant MRSA. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35: 345-350.
18. Akalın HE, Çelik E, Baykal M, Kardeş T: MRSA'ların bazı antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. *Ankem Derg.*, 1987, 1: 122.
19. Sultan N, Türet S: Metisiline dirençli stafilokok suşlarının yirmiüç antibiyotiğe dirençlerinin incelenmesi. *Ankem Derg.*, 1991, 5: 107.
20. Ansong R, Müller KD, Wiora J: Comparison of inhibitory and bactericidal activity of antipseudomonal antibiotics against *P.aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Chemotherapy*, 1990, 36: 222-229.