

KISA BİLDİRİ:
YARALARDAN İZOLE EDİLEN METİSİLİNE DİRENÇLİ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA MUPIROSİN DİRENCİNİN
ARAŞTIRILMASI

SHORT COMMUNICATION:
MUPIROCIN RESISTANCE IN METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS*
AUREUS STRAINS ISOLATED FROM WOUND INFECTIONS

İştar DOLAPÇI¹, Z. Ceren KARAHAN¹, Alper TEKELİ¹
Esra KOYUNCU¹, Alpay AZAP², Rıza ADALETİ³

ÖZET: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatları, hem toplumdan kazanılan hem de nozokomiyal enfeksiyonlarda önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Mupirosin, MRSA izolatlarına halen etkili bir kaç antibiyotikten birisidir. Bu çalışmanın amacı, Ankara ve İstanbul'daki iki farklı hastanede yatarak ve ayaktan takip edilen hastalardaki yaralardan izole edilen MRSA suşlarında mupirosin direncinin saptanmasıdır. Çalışmada, toplam 143 MRSA izolatında, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile mupirosin direnci araştırılmış ve sonuçlar E-test yöntemi ile MİK saptanarak doğrulanmıştır. Hem disk difüzyon hem de E-test yöntemi ile mupirosin direnci gösterilememiş ve toplam 143 MRSA izolatının mupirosine duyarlılığı %100 olarak saptanmıştır. Mupirosine dirençli MRSA izolatları sıklıkla yara kültürlerinden izole edilmektedir. Bu dirençten, büyük oranda topikal mupirosin kullanımı sorumlu tutulmaktadır. MRSA'larda mupirosin direncinin saptanmasında, seçilecek laboratuvar yöntemi ve sonuçların yorumlanması önemli parametreler olarak dikkat çekmektedir. Çalışmamızda iki farklı hastaneden izole edilen 143 MRSA izolatında mupirosin direncinin saptanmamış olması, bu bölgelerimiz açısından en azından şimdilik bir direnç problemi olmadığını göstermektedir. Dolayısıyla mupirosin, özellikle yara enfeksiyonlarının topikal tedavisinde güvenle kullanılabilecek bir antibiyotiktir.

Anahtar sözcükler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, mupirosin, yara enfeksiyonu.

ABSTRACT: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has emerged as an important pathogen in community-acquired and nosocomial infections. The unique bactericidal action of mupirocin makes it one of the few antibiotics still effective against MRSA. The purpose of this study was to investigate the mupirocin resistance in MRSA strains isolated from wound infections of in- and out-patients of two distinct hospitals located in Ankara and İstanbul. A total of 143 MRSA strains were included in the study. Mupirocin resistance was investigated by Kirby-Bauer disk diffusion method and the

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (dolapci@medicine.ankara.edu.tr)

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakterioloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

results were confirmed by determination of the MIC values by E-test strips. Among 143 MRSA isolates, mupirocin resistance was detected by none of the methods, and overall mupirocin sensitivity was detected as 100 percent. The majority of mupirocin resistant MRSA is isolated from wound infections. The aetiology mostly depends on the increased topical use of the agent. The method used in the detection of mupirocin resistance and interpretation of the results are important parameters in the determination of mupirocin resistance in MRSA strains. Since there was no resistant strain among 143 clinical isolates obtained from two different hospitals, it was concluded that, mupirocin resistance is not an important problem in these regions currently, and mupirocin may be safely used in treating wound infections.

Key words: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, mupirocin, wound infections

GİRİŞ

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının neden olduğu hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlar, tüm dünyada yaygın mortalite ve morbiditeye yol açmalarından dolayı günümüzde çok ciddi bir problem haline gelmiştir^{1,2}. Klinikte follikülit, fronkül, karbonkül, apse gibi lokalize *S.aureus* enfeksiyonlarının yanı sıra, cerrahi ya da travma sonrası yaraların direk kontaminasyonu sonucunda da *S.aureus*'a bağlı deri ve yumuşak doku enfeksiyonları görülebilmektedir³.

Metisiline direnç gösteren *S.aureus* izolatlarının aynı zamanda tüm penisilinlere, β -laktam / β -laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına, tüm sefalosporinlere, monobaktam ve karbapenemlere de direnç göstermeleri, tedavide büyük sorunlara yol açmaktadır^{4,5}. MRSA'lara hala etkili birkaç antibakteriyel ajandan birisi de mupirosindir. Mupirosin özellikle *S.aureus* burun taşıyıcılığının ve deri kolonizasyonunun eradikasyonu için kullanılan, klinik olarak bilinen en etkili antibiyotiktir⁶. Özellikle postoperatif MRSA enfeksiyonlarının önlenmesi amacıyla cerrahi öncesi nazal mupirosin uygulamalarının profilaktik olarak faydalı olduğunu ortaya koyan çalışmalar olmakla birlikte, mupirosinin yaygın kullanımı sonucunda dirençte artış izlendiğini bildiren yayınlar da bulunmaktadır^{7,8}.

Bu çalışmanın amacı, Ankara ve İstanbul'daki iki farklı hastanede yatarak ve ayaktan takip edilen hastalardaki yaralardan izole edilen MRSA suşlarında mupirosin direncinin saptanmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Aralık 2003-Nisan 2005 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda hastane enfeksiyonu etkeni olarak yara örneklerinden izole edilen 75 adet, İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda hastane enfeksiyonu etkeni olarak yara ve apse örneklerinden izole edilen 68 adet olmak üzere toplam 143 MRSA izolatu alındı. İzolatlar, koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri değerlendirilerek standart mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlandı³. Kontrol olarak *S.aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

Metisilin direncinin saptanmasında, oksasilin disk difüzyon testi yapıldı ve sonuçlar polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *mecA* geni varlığı ortaya konularak doğrulandı. Oksasilin disk difüzyon testi için, Mueller Hinton (MH) agar besiyerine (Oxoid), McFarland 0.5 bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları inoküle edildi ve besiyeri yüzeyine 1 µg oksasilin (Oxoid) içeren diskler yerleştirilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün inhibisyon zon çapları ölçülerek, değerlendirme CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standartlarına göre yapıldı⁹.

PCR yöntemi için kullanılacak bakteri DNA'sı, fenol-kloroform yöntemi ile elde edildi; *mecA1* ve *mecA2* primerleri kullanılarak 310 baz çiftlik *mecA* gen bölgesi çoğaltıldı⁵. Elde edilen ürünler, %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra etidyum bromürle boyanarak UV transillüminatör (TFX 20M, Vilber Lourmat, Fransa) ile görüntülendi.

MRSA izolatlarının mupirosin duyarlılıkları, 5 µg'lık mupirosin diski kullanılarak, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı ve inhibisyon zon çapı sınırları ≥ 14 mm ise duyarlı; ≤ 13 mm ise dirençli olarak kabul edildi^{10,11,12}. Mupirosin için MİK değerlerinin saptanması amacıyla E-test yöntemi kullanıldı. Bunun için %0.85'lik NaCl içerisinde 0.5 McFarland bulanıklığına göre hazırlanan bakteri süspansiyonları, %2 NaCl içeren MH besiyerine (Oxoid) inoküle edildi ve yüzeylerine mupirosin E-test şeritleri (AB Biodisk, İsveç) yerleştirildi. 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra, sonuçların yorumlanması E-test şeridi çevresinde oluşan elips şeklindeki inhibisyon zonunun şerit ile kesiştiği noktaya karşılık gelen değer, E-test şeridi üzerinden okunması ile yapıldı. MİK değeri 4 µg/ml'nin altında olan izolatlar duyarlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Oksasilin disk difüzyon testinde çalışmaya alınan tüm suşların inhibisyon zon çapları 10 mm'nin altında ölçülerek metisiline dirençli oldukları belirlenmiştir. PCR ile izolatların hepsinde metisilin direncinden sorumlu *mecA* geninin varlığı ortaya konulmuştur. Çalışılan suşların hiçbirisinde disk difüzyon ve E-test yöntemleri ile mupirosin direnci saptanmamıştır. İzolatların disk difüzyon testi zon çapları 16-26 mm arasında saptanmış; E-test yöntemi ile MİK değerleri 4 µg/ml'nin altında bulunmuştur.

Gerek iki ayrı hastanenin hastalarından izole edilen MRSA izolatları, gerekse yatarak ve ayakta tedavi gören hastalardan izole edilen MRSA izolatlarının mupirosin duyarlılıkları arasında fark bulunmamıştır.

TARTIŞMA

Günümüzde *S.aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde karşılaşılan en büyük sorun, hızla gelişen çoklu antibiyotik direncidir. Mupirosin, özellikle MRSA izolatlarına halen etkili birkaç antibakteriyel ajandan biri olmakla birlikte, çeşitli çalışmalarda farklı duyarlılık oranları bildirilmektedir^{1,2,6,7}. Mupirosin, *Pseudomonas fluorescens* tarafından üretilen doğal bir antibakteriyel ajandır. 1985 yılında

klirik kullanıma girmesinden iki yıl sonra ilk dirençli olgu bildirilmiştir^{6,13}. Mupirosin, izolözil-tRNA sentetaz inhibisyonu yoluyla bakteriyel protein sentezini önleyerek etki göstermektedir. Oral ve parenteral uygulandığında iyi absorbe olmakla birlikte metabolik yıkımının hızlı olması nedeniyle topikal kullanımı tercih edilmektedir^{8,14}.

Özellikle yoğun bakım ünitelerinde sistematik olarak MRSA taraması yapılmasının, olası enfeksiyonları önlemede maliyet/zarar analizi açısından faydalı olduğu bildirilmekte, ancak mupirosin ile nazal dekolonizasyon yapılmasının yararı tartışılmaktadır^{1,7,8,15,16}. Mupirosin MİK değerinin 8-256 mg/l olduğu düşük düzey direnç, genellikle hedef enzimdeki mutasyonlarla ortaya çıkar ve klinik önemi henüz belirsizdir. Ancak MİK değerinin 256 mg/l'den büyük olduğu yüksek düzey direnç, plazmidlerle taşınır ve hedef enzimi kodlayan ilave bir *ileS2* genine bağlıdır^{9,17,18}. MRSA'larda düşük ve yüksek düzey direnci sırasıyla %4-5 ve %3-4.8 oranları arasında bildiren çalışmalara karşın, yüksek düzey direncin saptanmadığı çalışmalar da vardır^{2, 7,17}.

Ülkemizde mupirosin 1991 yılında klinik kullanıma girmiştir, ancak mupirosin duyarlılığı ile ilgili çalışma sayısı fazla değildir. Bu çalışmalarda çoğunlukla nazal taşıyıcılardan izole edilen *S.aureus* suşları çalışılmış ve mupirosin direnci Özyurt ve arkadaşları¹⁹ tarafından %14.9, Şencan ve arkadaşları²⁰ tarafından %14.3 olarak saptanmıştır. Bu çalışmalarda, kullanılan suş sayılarının azlığının sonuçları etkileyebileceği düşünülmüştür. Ayrıca Özyurt ve arkadaşlarının¹⁹ çalışmasında mupirosin inhibisyon zon çapı 18 mm'nin altında olan suşların dirençli olarak kabul edildiği görülmüştür. Fidan ve arkadaşlarının²¹, zon çapı ≤ 17 mm olan suşları dirençli kabul ettikleri çalışmalarında, MRSA izolatlarının mupirosin direnci %3.5 oranında saptanmıştır. Şenbayrak-Akçay ve arkadaşları¹² ise, inhibisyon zon çapı sınırını 13 mm kabul ederek, mupirosin direncini %9 oranında bulmuşlardır. Nazal izolatlarda mupirosin direncinin daha yüksek seyrettiği izlenmektedir. Yine, hastanede kalma süresi arttıkça, burunda *S.aureus* kolonizasyon ihtimali de artmaktadır. Vardar-Ünlü ve arkadaşları²² MRSA'larda düşük düzey mupirosin direncini %31.6 gibi yüksek bir oranda bulmuşlar, ancak yüksek düzey direnç saptamamışlardır. Bu çalışmada kullanılan MRSA izolatlarının çeşitli klinik örneklerden izole edilmelerinin yanı sıra kan, kateter ucu gibi invaziv enfeksiyon etkenleriyle birlikte, burun izolatlarını da içermesinin, saptanan yüksek direnç oranını açıklayabileceği düşünülmüştür.

Özellikle yurt içi yayınlarda izlenen farklı direnç oranları üzerinde, disk difüzyon yönteminin yorumlanmasındaki farklılıklar etkili görülmektedir. Henüz *S.aureus* izolatlarında mupirosin direnci ile ilgili CLSI tarafından belirlenmiş bir standart bulunmamaktadır⁹. Bazı araştırmalarda inhibisyon zon çapı 13 mm ve altında olan suşların dirençli kabul edildikleri izlenirken¹⁰⁻¹², aynı miktarda (5 µg) mupirosin içeren disklerin kullanılmasına karşın, inhibisyon zon çapı sınırını 17-18 mm olarak alan kaynaklar da bulunmaktadır^{19,23}. Mupirosin için bugün kabul edilen ve yaygın olarak kullanılan MİK değerleri, BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) tarafından daha önce yayınlanmış olan değerlerdir (MİK<8 mg/L duyarlı, MIC=8-256mg/L düşük düzey dirençli, MIC $\geq$ 512 mg/L

yüksek düzey dirençli)²⁴⁻²⁶. Aynı kaynaklarda 5 µg'lık mupirosin diskleri ile yapılan antibiyogramlarda 21 mm ve altındaki inhibisyon zon çapı veren suşlar dirençli olarak gösterilmiş, ancak bu sonuçların E-test ya da bir başka yöntem ile MİK değerleri saptanarak doğrulanması gereği belirtilmiştir²⁴⁻²⁶. Bizim çalışmamızda, disk difüzyon yönteminde inhibisyon zon çapı olarak 13 mm kabul edilmiş ve sonuçlar E-test verileri ile uyumlu bulunmuştur. Bu durumda direnç sınırlarını 13 mm'nin üzerine çekmenin gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda, iki ayrı hastaneden elde edilen toplam 143 MRSA yara izolatı arasında mupirosine dirençli suş bulunmamıştır. Klinik örnekleri değerlendirilen hastalardan, hastaneye başvuru sırasında veya enfeksiyonun tespit edildiği anda burun sürüntüsü alınmadığından, bu hastaların MRSA ile kolonizasyon durumları ya da kolonize olmaları halinde bu izolatların mupirosin duyarlılığı araştırılamamıştır. Ancak polikliniğe başvuran hastaların MRSA burun kolonizasyonu açısından hastanede yatış gibi bir risk taşımadıkları varsayılacak olursa, bu hastalardaki yara enfeksiyonu etkenlerinin kolonizasyondan sorumlu suşlar olmadığını düşünebiliriz. Özellikle hastalardan eş zamanlı olarak alınan burun örneklerinin de araştırılmasını içeren daha kapsamlı çalışmalar konuya ışık tutacaktır. Sonuç olarak verilerimiz, mupirosin direncinin -en azından şimdilik- bu bölgelerimiz açısından ciddi bir problem oluşturmadığını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Muller A, Talon D, Potier A, Belle E, Cappelier G, Bertrand X. Use of intranasal mupirocin to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in intensive care unit. *Critical Care* 2005; 9:R246-50.
2. Caierao J, Berquo L, Dias C, d'Azevedo PA, Alegre P. Decrease in the incidence of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in carriers from an intensive care unit. *Am J Infect Control* 2006; 34: 6-9.
3. Brooks GF, Butel JS, Morse SA (eds). The Staphylococci, pp:223-30. In: Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 2004, 23rd ed. Appleton & Lange, USA.
4. Bartzavali-Louki C, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Polymerase chain reaction fingerprints of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece are related to certain antibiotypes. *J Microbiol Methods* 2003; 53:417-22.
5. Araj GF, Talhouk RS, Siman CJ, et al. Discrepancies between mecA PCR and conventional tests used for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 11:47-52.
6. Park DW, Kim MJ, Yang JA, Jeong HW, Sohn JW, Chun BC. Risk factors for isolation of low-level mupirocin-resistant versus -susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in intensive care units. *J Infect* 2006; Jul 20: [Epub ahead of print]
7. Fawley WN, Parnell P, Hall J, Wilcox MH. Surveillance for mupirocin resistance following introduction of routine peri-operative prophylaxis with nasal mupirocin. *J Hosp Infect* 2006; 62: 327-32.
8. Hurdle JG, O'Neill AJ, Mody L, Chopra I, Bradley SF. In vivo transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with failure of mupirocin prophylaxis. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:1166-8.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2005, 15th ed. Approved Standards M2-A8. CLSI, Pa.
10. Finlay JE, Miller LA, Poupard JA. Interpretive criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1137-9.

11. Fuchs PC, Jones RN, Barry AL. Interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing of mupirocin, a topical antibiotic. J Clin Microbiol 1990; 28: 608-9.
12. Şenbayrak-Akçay S, Oğuzoğlu N, Şengöz-İnan A, Küçükercan M, Çobanoğlu F. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının fusidik asit ve mupirosin duyarlılığı. Klimik Derg 2005; 18:117-20.
13. Cookson BD. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. J Antimicrob Chemother 1998; 41:11-8.
14. Chaves F, Garcia-Martinez J, Miguel S, Otero JR. Molecular characterization of resistance to mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant isolates of *Staphylococcus aureus* from nasal samples. J Clin Microbiol 2004; 42:822-4.
15. Suzuki Y, Kamigaki T, Fujino Y, Tominaga M, Ku Y, Kuroda Y. Randomized clinical trial of preoperative intranasal mupirocin to reduce surgical-site infection after digestive surgery. Br J Surg 2003; 90: 1072-5.
16. Kampf G, Kramer A. Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with an antiseptic soap and nasal mupirocin among colonized patients-an open uncontrolled clinical trial. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2004; 3: 9-14.
17. Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Wichelhaus TA. Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the antimicrobial resistance surveillance study of the Paul-Ehrlich Society for Chemotherapy, 2001. Int J Antimicrob Agents 2004; 23: 577-81.
18. Felek S. Mupirosin, s: 427-30. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (ed), Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. 2003, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
19. Özyurt M, Yenicesu M, Albay A, Kılıçer G, Vural A, Gün H. Son dönem böbrek yetmezliği olgularında *Staphylococcus aureus* burun taşıyıcılığı ve antibiyotik duyarlılığı. Enfeksiyon Derg 1998; 12: 343-6.
20. Şencan İ, Kaya D, Çatakoğlu N, Şahin İ, Bahtiyar Z, Yıldırım M. Hemodiyaliz hastalarında burunda metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı. Enfeksiyon Derg 2003; 17: 31-4.
21. Fidan I, Akyar I, Türet S, Rota S. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direncinin üç ayrı yöntemle saptanması ve metisiline dirençli suşların in vitro mupirosin duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol Bül 1997; 31: 345-50.
22. Vardar-Ünlü G, Ünlü M, Yağmuroğlu A. Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokok izolatlarında mupirosin direnci. Ankem Derg 2006; 4: 222-5.
23. Naguib MH, Naguib MT, Fournay DJ. Mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from veterans hospital. Chemotherapy 1993; 39: 400-4.
24. Andrews JM; SAC Working Party on Susceptibility Testing ft. BSAC standardized disc susceptibility testing method. J Antimicrob Chemother 2001; 48 (Suppl 1): 43-57.
25. Andrews JM; SAC Working Party on Susceptibility Testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). J Antimicrob Chemother 2005; 56: 60-76.
26. Andrews JM; SAC Working Party on Susceptibility Testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 5). J Antimicrob Chemother 2006; 58:511-29.