

METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOKOK İZOLATLARINDA GLİKOPEPTİD DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF GLYCOPEPTID RESISTANCE IN METHICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCAL ISOLATES

Mine HOŞGÖR LİMONCU¹, Şafak ERMERTCAN¹

Hüseyin TAŞLI¹, Semra KURUTEPE²

ÖZET: Günümüzde vankomisine orta düzeyde dirençli *S.aureus* (VISA) ve heterojen dirençli *S.aureus* (hVISA) suşlarının ortaya çıkmış olması tedavide büyük sorunlar yaratmaktadır. Bu çalışmada metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve koagülaz-negatif stafilokok (MRKNS) klinik izolatlarında glikopeptid direncinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakterioloji Laboratuvarı'nda Haziran 2005-Aralık 2006 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden (trakeal aspirat, kan, abse, yara sürüntüsü, balgam, kateter ucu, vb) izole edilen 120 stafilokok suşu (92 MRSA, 28 MRKNS) alınmıştır. Glikopeptid direnci 6 µg/mL vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agar plakları kullanılarak agar tarama testi ile araştırılmıştır. Agar tarama yöntemi ile elde edilen 17 (%14) stafilokok suşuna (10 MRSA, 7 MRKNS) standart E-test ve makro E-test yöntemi uygulanmıştır. Çalışmamızda, standart E-test yöntemiyle izolatların vankomisin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) aralığı 1.5-4 µg/mL, teikoplanin MİK aralığı ise 2-4 µg/mL olarak bulunmuştur. Vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri ≥8 µg/mL veya sadece teikoplanin MİK değeri ≥12 µg/mL olan suşlar hVISA olarak kabul edildiğinde, çalışmamızda VISA ve hVISA izolatına rastlanmamıştır. Sonuç olarak uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle rutin laboratuvarlarda tercih edilen ancak özgüllük ve duyarlılığı E-test yöntemine göre oldukça düşük olan agar tarama yönteminin, vankomisin direncinin araştırılmasında güvenilir olmayabileceği ve ülkemizdeki stafilokok izolatlarında vankomisine direnç durumunun belirlenmesi için standart yöntemlerin kullanıldığı çok merkezli çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: MRSA, MRKNS, VISA, hVISA, vankomisin, teikoplanin, direnç.

ABSTRACT: The emergence of *Staphylococcus aureus* strains with intermediate resistance (VISA) and heterogen resistance (hVISA) to vancomycin leads to the occurrence of severe therapeutic problems. The aim of this study was to investigate the vancomycin resistance in methicillin resistant *S.aureus* (MRSA) and coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) isolated from clinical samples in Bacteriology Laboratory of Microbiology and Clinical Microbiology Department of Celal Bayar University Faculty of Medicine, Manisa

* Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (2005/ECZ/004) tarafından desteklenmiştir.

¹ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. (mine.hosgor.limoncu@ege.edu.tr)

² Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa.

(located in western Anatolia, Turkey). A total of 120 staphylococcal strains (92 MRSA and 28 MRCoNS) isolated from different clinical specimens (tracheal aspirate, blood, abscess, wound swabs, sputum, catheter tips, etc) between the period of June 2005 to December 2006 were included to the study. Vancomycin resistance were determined by agar screening method using brain heart infusion agar plates containing 6 µg/mL vancomycin. Standard E-test and macro E-test methods were performed for 17 (14%) staphylococcal strains (10 MRSA and 7 MRCoNS) which had grown in agar screening plates. Vancomycin and teicoplanin minimal inhibitory concentration (MIC) ranges of those strains were found as 1.5-4 µg/mL and 2-4 µg/mL, respectively, by standard E-test method. In our study, no VISA and hVISA isolates were detected when MIC value of ≥ 8 µg/mL for vancomycin and teicoplanin, or ≥ 12 µg/mL for teicoplanin only were accepted as the criteria for hVISA determination. Agar screening method which is preferably used in routine laboratories for practical and economical reasons, lower sensitivity and specificity than E-test. It can be concluded that, since agar screening method is not reliable for the detection of vancomycin resistance, further multi-center studies with the use of standard methods are needed in order to clarify the vancomycin resistance patterns of staphylococci in our country.

Keywords: MRSA, MRCoNS, VISA, hVISA, vancomycin, teicoplanin, resistance.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus suşlarında vankomisine azalmış duyarlılık ilk kez 1997 yılında Japonya'dan bildirilmiştir¹. Bundan sonraki yıllarda da farklı coğrafi bölgelerden benzer izolatlar tanımlanmıştır². Vankomisine orta derecede dirençli *S.aureus* (VISA) olarak tanımlanan bu suşlardan sonra, heterojen dirençli stafilocok (hetero-VISA; hVISA) olarak adlandırılan ikinci tip direnç ortaya çıkmıştır. Bu tip dirence sahip suşların vankomisin MİK değeri duyarlılık sınırları içinde olduğu halde, topluluk içindeki $1/10^6$ bakteri vankomisinin 4 µg/mL'den daha yüksek konsantrasyonlarında üreyebilmektedir²⁻⁴. Vankomisin direncinin rutin laboratuvar yöntemleriyle saptanamaması, bu direncin anlaşılabilmesi ve nedeni konusunda birçok çalışma yapılmasına neden olmuştur. Bunun yanı sıra stafilocoklarda glikopeptid direncinin taranması ve doğrulanması için kullanılacak standart bir yöntem henüz geliştirilememiştir.

Bu çalışmada, hastanede yatan hastalardan izole edilen metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) ve koagülaz-negatif stafilocok (MRKNS) izolatlarında glikopeptid direnç oranlarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Haziran 2005-Aralık 2006 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakterioloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden (36 derin trakeal aspirasyon, 29 kan, 19 abse, 18 yara sürüntüsü, 8 balgam, 5 kateter ucu 2 efüzyon sıvısı, 2 idrar ve 1 biyopsi) izole edilen 92 MRSA ve 28 MRKNS olmak üzere toplam 120 stafilocok suşunun vankomisin direnci agar tarama yöntemiyle araştırıldı. Bakteriler çalışmaya alınincaya kadar %10'luk gliserinli buyyonda -86°C de saklandı. Tüm deneylerde Mu3 (standart hVISA suşu), Mu50 (standart VISA suşu) ve *S.aureus* ATCC 25913 (metisiline ve vankomisine duyarlı suş) kontrol suşları olarak kullanıldı.

Agar tarama yöntemi; “Centers for Disease Control” (CDC)⁵ önerileri doğrultusunda, 6 µg/mL vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon (BHI) agar besiyerinde yapıldı. Tarama plaklarında 24. saatte üreme gösteren bakteriler olası vankomisin dirençli, 48. saat üreyen bakteriler ise olası heterojen vankomisin dirençli stafilokok suşu olarak değerlendirildi. Agar tarama plaklarında üreme gösteren tüm izolatlar vankomisin ve teikoplanin için standart E-test ve makro E-test yöntemi uygulandı.

Standart E-test yöntemi için, kanlı agar besiyerindeki bir gecelik inkübasyonu takiben kültürlerden seçilen bir koloni Mueller-Hinton sıvı besiyerine ekilerek bir gece inkübe edildi. Daha sonra McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanan süspansiyonlardan BHI agar besiyerlerine yüzey ekimi yapıldı. Vankomisin ve teikoplanin (0.016-256 µg/mL) E-test şeritleri (AB Biodisk, İsveç) agar yüzeyine yerleştirilerek 35°C’de 48 saat inkübe edildi ve sonuçlar değerlendirildi.

Makro E-test yöntemi için, kanlı agar besiyerinde bir gecelik inkübasyondan sonra üreyen stafilokok kolonilerinden bir tanesi seçilerek BHI sıvı besiyerine ekim yapıldı ve bir gece 35°C’de inkübe edildi. Daha sonra McFarland 2 bulanıklığına ayarlanan süspansiyondan 200 µl alınarak BHI agar besiyerlerine yüzey ekimi yapıldı. Vankomisin ve teikoplanin (0.016-256 µg/mL) E-test şeritleri agar yüzeylerine yerleştirilerek 35°C’de inkübe edildi. Plaklar 24. ve 48. saatlerde değerlendirilerek MİK değerleri saptandı.

Vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri ≥ 8 µg/mL veya sadece teikoplanin MİK değeri ≥ 12 µg/mL olan suşlar hVISA olarak kabul edildi^{3,6}.

BULGULAR

Agar tarama yönteminde toplam 120 izolatın 17’si (%14) 6 µg/mL vankomisin içeren besiyerinde 48. saatte üreme göstermiştir. Bu 17 suşun 10’unun MRSA, 7’sinin ise MRKNS olduğu izlenmiştir. Standart E-test yöntemiyle, suşların vankomisin MİK aralığı 1.5-4 µg/mL, teikoplanin MİK aralığı 2-4 µg/mL olarak saptanmıştır. Makro E-test yöntemiyle ise vankomisin ve teikoplanin MİK değeri ≥ 8 µg/mL veya sadece teikoplanin MİK değeri ≥ 12 µg/mL olan suş saptanmamıştır. Suşların makro E-test yöntemiyle belirlenen vankomisin ve teikoplanin MİK sonuçları Tablo I’de verilmiştir.

Tablo I. Makro E-test Yöntemiyle Belirlenen Glikopeptid MİK Sonuçlarına Göre Suşların Dağılımı

	MİK (µg/mL)								
	1	1.5	2	3	4	6	8	12	Toplam
Vankomisin									
MRSA	–	–	4	2	4	–	–	–	10
MRKNS	–	–	2	5	–	–	–	–	7
Teikoplanin									
MRSA	–	1	2	–	–	2	5	–	10
MRKNS	–	–	–	1	3	2	1	–	7

TARTIŞMA

Staphylococcus aureus hastane kökenli enfeksiyonların önde gelen etkenlerindendir. Bu suşlarla gelişen sistemik enfeksiyonların tedavisinde vankomisin tek seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) suşlarında vankomisine direnç gelişimi hakkında 1997 yılına kadar doğrulanmış bir bildirim yapılmamıştır. Ancak, 1997 yılında Japonya'da yapılan bir çalışmada vankomisin MİK değeri 8 µg/mL olan MRSA suşları saptanmış ve sıklığının hastaneden hastaneye değişmekle birlikte %5-22 arası olduğu belirtilmiştir¹. Bu gelişme, MRSA tedavisinde vankomisinin tek seçenek olduğu durumlar göz önüne alındığında endişe vericidir⁷⁻⁹.

Vankomisine orta düzeyde dirençli *S.aureus*'ların ortaya çıkmasından çok kısa bir süre sonra 1997 yılında Hiramatsu ve arkadaşları¹ heterojen VISA olarak tanımladıkları yeni bir vankomisin direnç tipini bildirmişlerdir. Ardından ilk kez 2002 yılında Michigan'da olmak üzere vankomisine dirençli *S.aureus* (VRSA) izolatları tanımlanmıştır¹⁰. Vankomisine orta derecede duyarlı (VISA) suşların ve özellikle de hVISA izolatlarının rutin laboratuvarlarda saptanması oldukça sorunludur. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarında en sık kullanılan yöntemlerden disk difüzyon yöntemi ve otomatize sistemler ile güvenilir sonuçlar elde edilememektedir. Stafilokoklarda vankomisin direncinin araştırılmasında altın standart, popülasyon analiz profil (PAP) yöntemidir. Ancak bu yöntemin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanması oldukça zordur. Dolayısıyla bu direncin taranmasında ve saptanmasında alternatif yöntemler denenmiştir. Alternatif yöntemler arasında 6 µg/mL vankomisin içeren agar tarama yöntemi ve makro E-test yöntemleri yer almaktadır.^{5,8} Çalışmamızda da vankomisin direncinin saptanmasında, 6 µg/mL vankomisin içeren BHI agar tarama yöntemi kullanılmış, 48. saatte üreme gösteren 17 izolata standart ve makro E-test yöntemi uygulanmıştır. Suşların makro E-testle belirlenen MİK değerleri, direnç sınırlarının altında olup, hVISA izolatları saptanmamıştır.

Vankomisine orta düzeyde dirençli *S.aureus* oranının ülkeler arasında, hatta aynı ülkede yapılan çalışmalar arasında bile büyük farklılıklar göstermesi, stafilokoklarda glikopeptid direncini saptamada standart bir yöntemin olmamasından kaynaklanabilir^{1,8,15}. Türkiye'de yapılan çalışmalarda, VISA için %0-1.3, hVISA için ise %0-17.97 olmak üzere oldukça farklı oranlarda direnç saptanmıştır^{3,11}. Nakipoğlu ve arkadaşları⁴ yaptıkları çalışmada, 81'i *S.aureus*, 54'ü KNS olmak üzere toplam 135 stafilokok suşuna agar tarama yöntemi ve ardından vankomisin ve teikoplanin için agar dilüsyon yöntemini uygulamışlar, sonuçların doğrulanması için popülasyon analiz profil yöntemini kullanmışlardır. Araştırmacılar hVISA saptamazken, teikoplanine orta düzeyde direnç oranını *S.aureus* suşlarında çok düşük (%1.2), buna karşın MRKNS'larda yüksek (%13) bulmuşlardır⁴. 2003 yılında KNS'larla yapılan bir çalışmada, vankomisine azalmış duyarlılık oranı %3.9 olarak bildirilmiştir¹². Bizim çalışmamızda ise VISA ve hVISA izolatı saptanmamıştır. Bunun nedeni, çalışmamızda tüm izolatlara makro E-test yönteminin ve altın standart olarak kabul edilen popülasyon analizi yönteminin uygulanmamış olması olabilir.

Son yıllardaki verilere göre hem *S.aureus* hem de KNS suşlarında vankomisin MİK değerleri gittikçe yükselmektedir^{10,13}. Avrupa’da yapılan çalışmalarda hVISA oranları ülkelere göre değişmekle birlikte %0.21-20, Asya’da ise %0.5-1.9 arasında bildirilmiştir¹⁴⁻¹⁷. Ankara’da yapılan bir çalışmada, hVISA oranı 1998 yılında %1.6 iken 2001 yılında bu oranın %36’ya çıktığı gözlenmiş ve bu artış araştırmacılar tarafından hastanedeki yaygın glikopeptid kullanımına bağlanmıştır³.

Uygulama kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle rutin laboratuvarlarda vankomisin direncinin araştırılmasında 6 µg/mL vankomisin içeren BHI agar tarama yöntemi kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemin özgüllük ve duyarlılığı, maliyeti yüksek olan E-test yöntemine göre oldukça düşüktür. Altın standart olarak kabul edilen popülasyon analizi yönteminin ise rutin laboratuvarlarda uygulanması oldukça zordur. Sonuç olarak ülkemizdeki stafilokok isolatlarında vankomisine direnç durumunun belirlenmesi için standart yöntemlerin kullanıldığı ve çok merkezli çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 1670-3.
2. Nunes APF, Teixeira LM, Iorio NLP, et al. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27: 307-15.
3. Sancak B, Erciş S, Menemenlioğlu D, Çolakoğlu Ş, Haşçelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 519-23.
4. Nakipoğlu Y, Derbentli Ş, Çağatay AA, Katrancı H. Investigation of *Staphylococcus* strains with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish University Hospital. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 1-8.
5. VISA/VRSA; Vancomycin-Intermediate/Resistant *Staphylococcus aureus* Laboratory Detection. <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/Lab/FactSheet/vrsa.htm>
6. Walsh TR, Bolmström A, Qvarnström A, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2439-44.
7. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 135-6.
8. Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1020-7.
9. Avison MB, Bennett PM, Howe RA, Walsh TR. Preliminary analysis of the genetic basis for vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 255-60.
10. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States. *Morbidity Mortality Weekly Report (MMWR)* 2002; 51: 565-7.
11. Yaygın YE. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* kökenlerinde vankomisin direncinin araştırılması. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, İzmir, 2005.
12. Center KJ, Reboli AC, Hubler R, Rodgers GL, Long SS. Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4660-5.

13. Hussain FM, Boyle-Vavra S, Shete PB, Daum RS. Evidence for a continuum of decreased vancomycin susceptibility in unselected *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Infect Dis 2002; 186: 661-7.
14. Bierbaum G, Fuchs K, Lenz W, Szekat C, Sahl HG: Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 691-6.
15. Chesneau O, Morvan A, Solh NE. Retrospective screening for heterogeneous vancomycin resistance in diverse *Staphylococcus aureus* clones disseminated in French hospitals. J Antimicrob Chemother 2000; 45: 887-90.
16. Trakulsomboon S, Danchaivijitr S, Rongrungruang Y. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. J Clin Microbiol 2001; 39: 591-5.
17. Kim MN, Hwang SH, Pyo YJ, Mun HM, Pai CH. Clonal spread of *Staphylococcus* heterogenously resistant to vancomycin in a university hospital in Korea. J Clin Microbiol 2002; 40: 1376-80.
18. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet 2001; 1: 147-55.