

METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOKOKLARDA TİGESİKLİNİN İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

IN VITRO ACTIVITY OF TIGECYCLINE AGAINST METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI

Ferda TUNÇKANAT¹, Zeynep SARIBAŞ¹, Serpil ERCİS¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
(ftuncan@hacettepe.edu.tr)

ÖZET

Glisilsiklin grubu antibiyotikler, tetrasiklinlerin 9. pozisyonuna glisilamido grubunun eklenmesi ile oluşturulmuş, yarı sentetik yeni bir ilaç grubudur. Minosiklinden türetilmiş olan tigesiklin, glisilsiklin grubu antibiyotiklerin ilk üyesidir. Geniş bir etki spektrumuna sahip olan tigesiklin, bilinen tetrasiklin direnç mekanizmalarından etkilenmemektedir. Çalışmalar bu ilacın birçok gram-pozitif ve gram-negatif bakteriyeye karşı etkinliğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın amacı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesinde klinik örneklerden izole edilen ve "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda uygulanan disk difüzyon yöntemi ile metisiline dirençli olduğu saptanan stafilokoklarda tigesiklinin in vitro etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu amaçla çalışmaya alınan metisiline dirençli 127 *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve 42 koagülaz-negatif stafilokok (MRKNS) izolatı, tigesiklin ve ayrıca vankomisin, linezolid, kinupristin-dalfopristin ve trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) duyarlılıkları açısından incelenmiştir. Tigesiklin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri E-test yöntemi ile saptanmış; linezolid, kinupristin-dalfopristin, TMP-SMZ duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile, vankomisin duyarlılığı ise agar tarama yöntemi ile ve gerektiği durumlarda E-test ile MİK değerleri saptanarak belirlenmiştir. Tigesiklin MİK değer aralıkları, çalışmaya alınan 127 MRSA suşu için 0.032-1 µg/ml (MİK₅₀ 0.25 µg/ml, MİK₉₀ 0.75 µg/ml), MRKNS izolatları için ise 0.047-1 µg/ml olarak (MİK₅₀ 0.25 µg/ml, MİK₉₀ 0.5 µg/ml) saptanmıştır. Beklenildiği üzere tüm izolatlar vankomisin, linezolid ve kinupristin-dalfopristine duyarlı bulunmuş; 7 (%5.5) MRSA ve 26 (%60.5) MRKNS izolatında TMP-SMZ direnci gözlenmiştir. MRKNS izolatlarında TMP-SMZ direncinin oldukça yüksek oranda saptanmasına rağmen, MRSA izolatlarında bu oranın düşük olması, çalışmamızın dikkat çekici bir bulgusu olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak verilerimiz, tigesiklinin, hastanemizde klinik örneklerden izole edilen MRSA ve MRKNS'lara karşı gayet iyi bir in vitro aktivite gösterdiğini ortaya koymakla birlikte, daha çok sayıda izolatin çalışıldığı ileri araştırmalara gerek vardır.

Anahtar sözcükler: Tigesiklin, *Staphylococcus aureus*, koagülaz-negatif stafilokok, metisilin direnci, antibiyotik direnci.

ABSTRACT

Glycylcyclines are novel semisynthetic group of antibiotics that have been produced by substitution of glyclamido group at position 9 of tetracyclines. Tigecycline derived from minocycline is the first member of glycylcyclines. This new antibiotic has a broad spectrum of activity against variety of gram-positive and gram-negative bacteria and is not affected by known tetracycline resistance mechanisms. The aim of this study was to investigate the in-vitro activity of tigecycline as well as vancomycin, linezolid, quinupristin-dalfopristin and trimethoprim-sulphamethoxazole (TMP-SMX) against methicillin-resistant staphylococci isolated from clinical specimens of adult patients in Hacettepe University Hospital. For this purpose 127 *Staphylococcus aureus* (MRSA) and 42 coagulase negative staphylococci (MRCNS) which had been shown to be resistant to methicillin by disc diffusion method performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines, were evaluated. In these isolates minimum inhibitory concentration (MIC) values of tigecycline were detected by E-test; susceptibilities to linezolid, quinupristin-dalfopristin, TMP-SMX were detected by disc diffusion test. All of the isolates were searched for decreased susceptibility to vancomycin by agar screening method and MIC values of vancomycin were detected by E-test for the strains that grew on vancomycin agar plates. The range of MIC values of tigecycline were 0.032-1 µg/ml for the 127 MRSA isolates (MIC₅₀ 0.25 µg/ml, MIC₉₀ 0.75 µg/ml) and were 0.047-1 µg/ml (MIC₅₀ 0.25 µg/ml, MIC₉₀ 0.5 µg/ml) for the MRCNS isolates. All staphylococcal isolates were found to be susceptible to vancomycin, linezolid and quinupristin-dalfopristin. TMP-SMX resistance was detected in 7 (5.5%) MRSA and 26 (60.5%) MRCNS isolates. The results of this study demonstrated very good in-vitro activity of tigecycline against both MRSA and MRCNS isolates in our hospital. A remarkable finding of the present study was demonstration of the quite low rate of TMP-SMX resistance among MRSA isolates whereas MRCNS isolates showed high rate of resistance.

Key words: *Tigecycline, Staphylococcus aureus, coagulase-negative staphylococci, methicillin resistance, antibiotic resistance.*

GİRİŐ

Glisilsiklin grubu antibiyotikler, tetrasiklinlerin 9. pozisyonuna glisilamido grubunun eklenmesi ile oluşturulmuş yeni bir yarı sentetik ilaç grubudur. Tigesiklin, glisilsiklin grubu antibiyotiklerin ilk üyesi olup minosiklin den türetilmiştir¹. Bu ilaç bakteri ribozomunun 30S alt ünitesine bağlanarak aminoasillenmiş transfer RNA'nın A bölgesine girişini ve böylece yeni aminoasitlerin oluşan peptid zincirine bağlanmasını engelleyerek protein sentezini inhibe eder². Tigesiklinin ribozomal bağlanma bölgesi olan 16S rRNA'ya tetrasiklinlerden 5 kat daha yüksek bir afiniteyle bağlanması bu ilacın hem daha geniş bir etki spektrumuna sahip olmasını, hem de bilinen tetrasiklin direnç mekanizmalarından etkilenmemesini sağlamaktadır^{2,3}. Tetrasiklinlere karşı direnç başlıca iki mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. Bunlar efluks mekanizması (geri atım pompaları) ve ribozomal korumadır. Tigesiklin bu iki direnç mekanizmasından da etkilenmemektedir^{4,5}. Çalışmalar, bu ilacın birçok dirençli gram-pozitif ve gram-negatif bakteriye karşı etkinliğini ortaya koymaktadır. Metisiline dirençli stafilkoklar, vankomisine dirençli enterokoklar gibi tedavide büyük sorun oluşturan gram-pozitif bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak seçeneklerin sayısı giderek azalmaktadır. Metisiline dirençli stafilkok enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisinin yanı sıra linezolid, kinupristin-dalfopristin, tigesiklin ve daptomisin gibi yeni antibiyotiklerin ve ayrıca klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) gibi bazı eski antibiyotiklerin kullanılması söz konusudur^{6,7}.

Bu çalışmanın amacı, klinik örneklerden izole edilen ve metisiline direnç gösterdiği saptanan stafilkoklarda tigesiklinin in vitro etkinliğinin araştırılarak, vankomisin, linezolid, kinupristin-dalfopristin ve TMP-SMZ duyarlılık durumları ile karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Nisan 2003-Şubat 2004 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagülaz-negatif stafilkoklardan enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilen izolatlar seçilerek, bunlarda metisilin direnci "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterleri doğrultusunda Mueller-Hinton (MH) besiyerinde 1 µg oksasilin ve ayrıca 30 µg sefoksitin diski kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı⁸. İki farklı disk ile elde edilen sonuçlar arasında uyumsuzluk olduğu durumlarda E-test yöntemi ile oksasilin MİK değerleri belirlendi. Metisilin direnci gösteren 127 *S.aureus* (MRSA) ve 42 koagülaz-negatif stafilkok (MRKNS) izolatı tigesiklin ve ayrıca vankomisin, linezolid, kinupristin-dalfopristin ve TMP-SMZ duyarlılıkları açısından incelendi. Tigesiklin MİK değerleri MH besiyerinde E-test (AB Biodisk, Solna, Sweeden) yöntemi ile saptandı. Sonuçların değerlendirilmesinde Amerika Birleşik Devletleri'nde "Food and Drug Administration (FDA)" ve Avrupa'da "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" komitesince belirlenmiş olan ≤ 0.5 µg/ml sınır değer olarak alındı^{9,10}. Linezolid, kinupristin-dalfopristin ve TMP-SMZ duyarlılıkları CLSI kriterleri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile; vankomisin duyarlılığı ise 6 µg/ml vankomisin eklenmiş Brain heart infusion (BHI) agar besiyerinde agar tarama yöntemi ile saptandı⁸. Agar tarama plaklarında üreme gözlenen izolatlarda vankomisin MİK değerleri E-test yöntemi ile belirlendi. Kontrol suşları olarak *S.aureus* ATCC 29213 ve ATCC 25923 kullanıldı. Tigesiklin MİK değerleri ≥ 1 µg/ml bulunan izolatlar için duyarlılık testleri, FDA ve EUCAST önerileri doğrultusunda bir kez ya da gerektiği durumlarda iki kez daha tekrarlandı^{9,10}.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 127 MRSA ve 42 MRKNS izolatında tigesiklin MİK değer aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo I'de görülmektedir.

Tüm izolatlar vankomisin, linezolid ve kinupristin-dalfopristine duyarlı bulunmuş, TMP-SMZ direnci 7 (%5.5) MRSA ve 26 (%60.5) MRKNS izolatında saptanmıştır.

Tablo I. Stafilkok İzolatlarında Saptanan Tigesiklin MİK Değer Aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ Değerleri

İzolat (sayı)	MİK aralıkları (µg/ml)	MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
MRSA (127)	0.032-1	0.25	0.75
MRKNS (42)	0.047-1	0.25	0.50

TARTIŞMA

Tetrasiklinlerden türetilmiş yeni bir yarı sentetik ilaç grubu olan glisilsiklinlerin ilk üyesi olan tigesiklinin, stafilokoklar da dahil olmak üzere çeşitli gram-pozitif ve gram-negatif bakteriye karşı gayet iyi bir in vitro aktivite gösterdiği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur¹¹⁻¹⁵. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesinde klinik örneklerden izole edilen ve metisiline direnç gösterdiği saptanan stafilokoklarda tigesiklinin in vitro etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmada da, tigesiklin çalışma kapsamına alınan 127 MRSA ve 42 MRKNS izolatına karşı gayet iyi bir in vitro aktivite göstermiştir. Klinik ve in vitro çalışmalarda diğer birçok bakteride olduğu gibi stafilokoklarda da tigesiklin direnci henüz gösterilememiştir. Ancak tigesiklin oksijene çok duyarlı bir antibiyotik olduğu için test koşullarından çok çabuk etkilenebilmektedir. Özellikle sıvı besiyerinde yapılan duyarlılık çalışmalarında, taze hazırlanmış besiyeri kullanılmadığı durumlarda besiyeri oksijenasyonuna bağlı olarak yüksek MİK değerleri saptanabilmektedir^{9,16,17}. Bu çalışmada E-test yöntemi ve dolayısıyla katı besiyeri kullanılmasına rağmen, bazı izolatlarda yüksek MİK değerleri saptanmıştır. Başlangıçta MİK değeri ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ olan 8 MRSA izolatı ile 2 MRKNS izolatında test bir kez gerektiğinde de iki kez daha tekrarlanmıştır. Bunlardan 3 MRSA ile 1 MRKNS izolatında tekrarlanan testlerde daha düşük MİK değerleri saptanırken, 5 MRSA ve 1 MRKNS izolatında MİK değerleri = 1 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edilmiştir. Bu da tigesiklin için uygulanan in vitro duyarlılık test sonuçlarının test parametrelerindeki en küçük değişikliklerden etkilendiğini bir kez daha ortaya koymaktadır^{16,17}. Bu çalışmada bulunan en yüksek değer olan 1 $\mu\text{g/ml}$ MİK değeri, FDA ve EUCAST tarafından belirlenen 0.5 $\mu\text{g/ml}$ sınır değerinin üzerindedir. Ancak gerek testimizin tekrarlarında hep aynı sonucun elde edilmesi, gerekse diğer bazı çalışmalarda da stafilokoklarda 1 $\mu\text{g/ml}$ MİK değerlerinin saptanmış olması nedeniyle bu sonuçların, gerçek MİK değerlerini yansıttığı düşünülmüştür¹²⁻¹⁵.

Bu çalışmada tüm izolatlar vankomisin, linezolid ve kinupristin-dalfopristine duyarlı bulunmuştur. Çalışmanın kayda değer bir bulgusu, MRKNS izolatlarında yüksek bulunan TMP-SMZ direncinin (%60.5) MRSA izolatlarında oldukça düşük oranda (%5.5) saptanmış olmasıdır. Bu oran daha önceki bir çalışmamızda %12 olarak tespit edilmiştir¹⁸. TMP-SMZ direncinin hastanemizde halen oldukça düşük oranlarda görülmesi, bu eski antibiyotiklerin MRSA ile gelişen bazı stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde, daha yeni antibiyotiklere iyi bir alternatif oluşturmaya devam ettiğini göstermesi açısından önemli bir bulgudur.

Tigesiklin, benzer çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda da MRSA ve MRKNS klinik izolatlarına gayet iyi bir in vitro etkinlik göstermiştir. Sonuçlarımız bu antibiyotiklerin hastanemizde, diğer alternatiflerinin yanı sıra, metisiline dirençli stafilokokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek iyi bir seçenek olduğunu göstermektedir. Bu konuda daha geniş kapsamlı in vitro ve klinik çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Olson MW, Ruzin A, Feyfant E, Rush III TS, O'Connell J, Bradford PA. Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2156-66.
2. Greer ND. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylycylcline class of antibiotics. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2006; 19: 155-61.
3. Nathwani D. Tigecycline: clinical evidence and formulary positioning. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 185-92.
4. Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 611-4.
5. Jones CH, Tuckman M, Howe AY, et al. Diagnostic PCR analysis of the occurrence of methicillin and tetracycline resistance genes among *Staphylococcus aureus* isolates from phase 3 clinical trials of tigecycline for complicated skin and skin structure infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 505-10.
6. Cormican MG, Jones RN. Emerging resistance to antimicrobial agents in gram-positive bacteria. Enterococci, staphylococci and nonpneumococcal streptococci. *Drugs* 1996; 51 (Suppl 1): 6-12.
7. Eliopoulos GM. Antimicrobial agents for treatment of serious infections caused by resistant *Staphylococcus aureus* and enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 826-31.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17th Informational Supplement. M100-S17. 2007. CLSI, Wayne, PA.
9. Peterson LR. Antimicrobial activity and pharmacokinetics/ pharmacodynamics of the novel glycylycylcline, tigecycline. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 163-4.
10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Steering Committee. EUCAST technical note on tigecycline. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 1147-9.
11. Hoban DJ, Bouchillon SK, Johnson BM, Johnson JL, Dowzicky MJ. Tigecycline evaluation and surveillance trail (TEST Program) group. In vitro activity of tigecycline against 6792 gram-negative and gram-positive clinical isolates from the global tigecycline evaluation and surveillance trial (TEST Program, 2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 215-27.
12. Bouchillon SK, Hoban DJ, Johnson MB, Johnson JL, Hsiuing A, Dowzicky MJ. In vitro activity of tigecycline against 3989 gram-negative and gram-positive clinical isolates from United States tigecycline evaluation and surveillance trial (TEST program 2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 173-9.
13. Fritsche TR, Sader HS, Stilwell MG, Dowzicky MJ, Jones RN. Antimicrobial activity of tigecycline tested against organisms causing community-acquired respiratory tract infection and nosocomial pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 187-93.
14. Sader HS, Jones RN, Stilwell MG, Dowzicky MJ, Fritsche TR. Tigecycline activity tested against 26,474 bloodstream infection isolates: A collection from 6 continents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 181-6.
15. Sader HS, Jones RN, Dowzicky MJ, Frische TR. Antimicrobial activity of tigecycline tested against nosocomial bacterial pathogens from patients hospitalized in the intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 203-8.
16. Bradford PA, Petersen PJ, Young M, Jones CH, Tischler M, O'Connell J. Tigecycline MIC testing by broth dilution requires use of fresh medium or addition of the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase to standardize the test method. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3903-9.
17. Petersen PJ, Bradford PA. Effect of medium age and supplementation with biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase on in vitro activities of tigecycline against recent clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3910-8.
18. Arıkan S, Tunçkanat F, Özalp M, Günalp A. *Staphylococcus aureus* suşlarında bazı makrolid antibiyotiklere ve trimetoprim sulfametoksazole duyarlılığın metisilin direnci ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 1994; 28: 333-7.