

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Metisiline ve Diğer Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları

F. F. COŞKUN-ARI, A. TANER, G. BOŞGELMEZ-TINAZ, M. TANER

Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Isparta.

Özet: Stafilocokların antibiyotiklere duyarlılıkları zaman içerisinde değişmekte ve farklı direnç oranları görülebilmektedir. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen toplam 183 *S. aureus* suşunun metisiline duyarlılıkları oksasilin disk difüzyon ve E-testi yöntemleri ile belirlenmiştir. Metisilin direnç oranı her iki yöntem ile %63 (115/183) olarak tespit edilmiştir. Metisiline dirençli (MRSA) 115 ve metisiline duyarlı (MSSA) 68 *S. aureus* suşunda diğer antibiyotiklere duyarlılık disk difüzyon yöntemiyle araştırılmış ve MRSA'larda %11.3 direnç oranı ile trimetoprim/sulfametoksazolün en etkili antibiyotik olduğu tespit edilirken, diğer antibiyotiklere %63-96 arasında değişen yüksek oranda direnç gözlenmiştir. MSSA'larda ise %42.6 oranı ile siprofloksasin en fazla direnç tespit edilen antibiyotik olup, diğer antibiyotiklere nispeten düşük oranlarda direnç (%2.9-23.5) saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: MRSA, disk difüzyon testi. E-testi, antibiyotik direnci.

Susceptibility To Methicillin And Various Antibiotics In Clinical Isolates Of *Staphylococcus aureus*

Abstract: Antibiotic susceptibilities of staphylococci change in time and different resistance rates might be observed. In this study, methicillin susceptibilities of a total number of 183 *S. aureus* strains isolated from clinical specimens were determined by the oxacillin disc diffusion and E-test methods. Resistance rate for methicillin was 63% (115/183) with both methods. 115 methicillin resistant (MRSA) and of 68 methicillin sensitive (MSSA) *S. aureus* isolates were tested for their sensitivities to various antibiotics by the disc diffusion method, and trimethoprim-sulfamethoxazole with the resistance rate of 11.3% was found to be the most effective antibiotic in MRSA, whereas much higher resistance (63-96%) was observed against the rest of antibiotics used. In MSSA, the highest resistance was detected against ciprofloxacin with the rate of 42.6%, while much lower resistance rates were observed (2.9-23.5%) with the other antibiotics tested.

Keywords: MRSA, disc diffusion test, E-test, antibiotic resistance.

Giriş

Toplum ve hastane kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenlerinden olan stafilocoklar, bir çok sistemik ve lokal hastalıklara neden olmaları ve mevcut antibiyotiklerin çoğuna da direnç geliştirmeleri nedeniyle sorun oluşturmaktadır [1]. 1940'ların başında penisilin klinik kullanımına girmesi ile stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir başarı elde edilmekle birlikte stafilocoklarda penisilin direncinin 1940'lı yılların ortalarından itibaren giderek arttığı görülmüştür. 1960'larda stafilocoklar tarafından üretilen ve penisilini parçalayan penisilinaza dayanıklı metisilin gibi penisilin türevlerinin geliştirilmesiyle stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde ikinci kez başarı sağlanmıştır. Ancak kısa bir süre sonra stafilocoklarda metisilin direnci tanımlanmış ve 1980'li yılların başından itibaren de metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarında çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır [2].

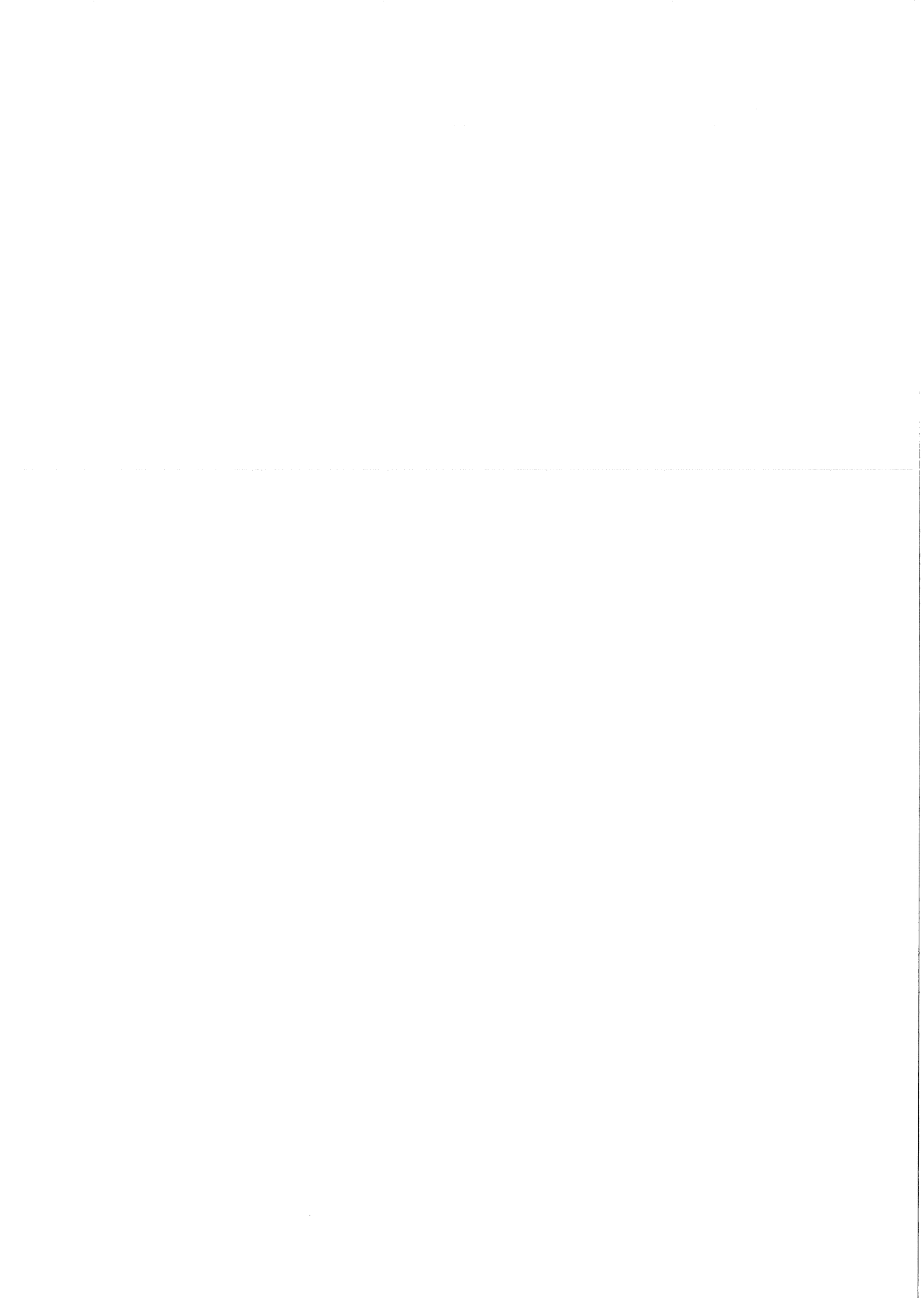
MRSA suşları genellikle Gram-pozitif organizmalara karşı etkili olan bir çok antibiyotiğe karşı dirençlidir [3]. Bu nedenle, MRSA'ların doğru teşhisi, infeksiyonlarının kontrol altında tutulması ve hastane ortamında yayılımının önlenmesi son derece önemlidir.

Bu çalışmada, hastane kaynaklı *S. aureus* suşlarında metisilin direnci olup olmadığı disk difüzyon ve E-testi ile belirlendikten sonra MRSA ve MSSA'ların çeşitli antibiyotiklere duyarlılık ve direnç oranları araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Isparta Devlet Hastanesi klinik laboratuvarlarında hasta materyallerinden izole edilen 183 *S. aureus* suşu çalışma kapsamına alındı. İzolatlar; koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri ile tanımlandı [4]. Klinik laboratuvarlarında metisiline duyarlılığın saptanmasında metisiline göre daha stabil olan oksasilin kullanıldığından çalışmamızda da oksasilin disk difüzyon ve E-testleriyle izolatların metisiline duyarlılığı belirlendi. MRSA ve MSSA olduğu saptanan suşların diğer antibiyotiklere direnç oranları ise yine disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. Tüm testler "National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)'in önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

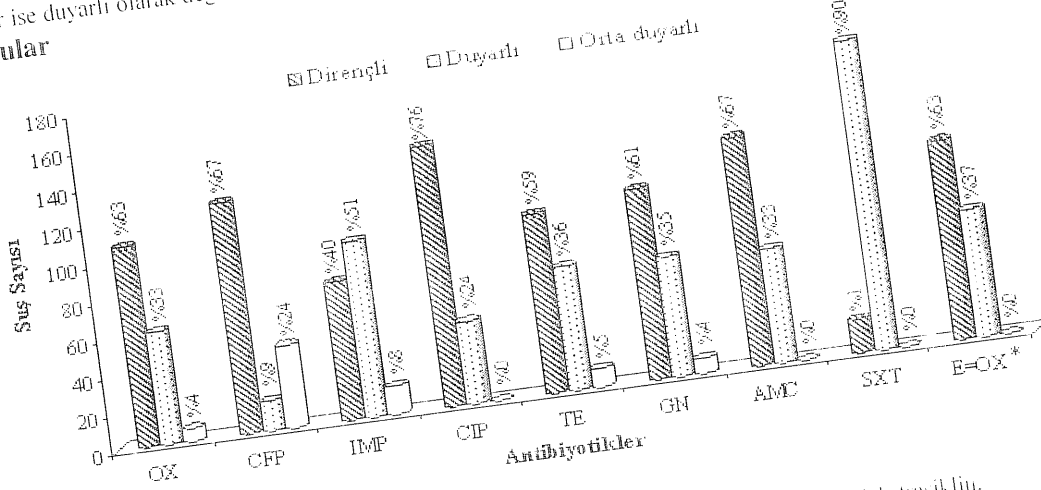
Disk Difüzyon Testi: Her izolatın Tryptic Soy Broth besiyeri ile McFarland 0.5 bulanıklığında hazırlanan 2cc'lik süspansiyonu Mueller-Hinton Agar besiyeri üzerine yayıldı. Oksasilin (OX, 1 µg), Sefoperazon (CFP, 75µg), İmipenem (IMP, 10µg), Siprofloksasin (CIP, 1µg), Tetrasiklin (TE, 30µg), Gentamisin (GN, 10µg), Amoksisilin/Klavulanik asit (AMC, 30µg), Trimetoprim/Sulfametoksazol (SXT, 25µg) antibiyotik diskleri (Oxoid, England) besiyeri üzerine yerleştirildi ve 35°C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben bu disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları milimetrik cetvel ile ölçülerek NCCLS'nin önerileri doğrultusunda



dirençli, duyarlı ve orta duyarlı olarak değerlendirildi [5]. Metisiline orta duyarlı bulunan suşlar için oksasilin disk difüzyon testleri %2'lik NaCl içeren Mueller-Hinton Agar kullanılarak tekrarlandı ve bu durumları doğrulandı. **E-Testi:** Her izolatın Triptik Soy Broth besiyeri ile McFarland 0.5 bulanıklığında hazırlanan 2cc'lik süspansiyonu, Mueller Hinton Agar besiyeri üzerine yayıldı. Oksasilin E-test (AB BIODISK,Sweden) şeritleri besiyeri üzerine yerleştirildi. 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra oksasilin için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri belirlendi ve NCCLS'nin önerdiği MİK değerleri ile karşılaştırılarak MİK değeri 4 µg/ml ve üzerinde olanlar dirençli, 2 µg/ml ve daha düşük olanlar ise duyarlı olarak değerlendirildi [6].

Bu çalışmada kullanılan hastane kaynaklı toplam 183 *S. aureus* izolatının oksasilin disk difüzyon, oksasilin E-testi ve diğer antibiyotiklerin disk difüzyon analizleri sonucunda elde edilen genel bulgular Şekil 1'de özetlenmiştir. Oksasilin disk difüzyon analiz sonuçlarına göre, 183 *S. aureus* suşunun 115'i metisiline dirençli (%63), 60'i duyarlı (%33) ve 8'i orta duyarlı (%4) bulunmuştur. Oksasilin E-testi sonuçlarına göre de yine aynı 115 suşun metisiline dirençli (%63) olduğu saptanmıştır. Ancak E-testi, disk difüzyon yöntemi ile orta duyarlı bulunan 8 suşun dışında metisiline hassas olduklarını ortaya koymuştur ve 183 suşdan toplam 68'inin metisiline duyarlı (%37) olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).

Bulgular



* Oksasilin E-test
OX:Oksasilin, CFP:Sefoperazon, IMP:İmipenem, CIP:Siprofloksasin, TE:Tetrasiklin, GN:Gentamisin, AMC:Amoksisilin-klavulanik asit, SXT:Trimetoprim-sulfametoksazol.

Şekil 1. *S. aureus* izolatlarının metisiline ve diğer bazı antibiyotiklere duyarlılıkları.

Metisiline dirençli (MRSA) ve duyarlı (MSSA) suşlarda diğer antibiyotiklere duyarlılık araştırıldığında MRSA'larda trimetoprim/ sulfametoksazolün en etkili antibiyotik (%11.3) olduğu tespit edilirken, diğer antibiyotiklere %63-96 arasında değişen direnç oranlarında direnç saptanmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. MRSA ve MSSA Suşlarının Diğer Antibiyotiklere Direnç Oranları.

Antibiyotikler	MRSA n=115			MSSA n=68		
	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Orta duyarlı n (%)	Dirençli n (%)	Duyarlı n (%)	Orta duyarlı n (%)
SXT	13 (11.3)	102 (88.7)	0	5 (7.4)	63 (92.6)	0
GN	106 (92.3)	7 (6.1)	2 (1.7)	5 (7.4)	57 (83.8)	6 (8.8)
IMP	72 (63)	28 (24)	15 (13)	2 (2.9)	66 (97)	0
CIP	110 (96)	5 (4.3)	0	29 (42.6)	39 (57.4)	0
TE	97 (84.3)	16 (13.9)	0	10 (14.7)	50 (73.5)	8 (11.7)
AMC	107 (93)	8 (7)	2 (1.74)	15 (22.1)	53 (77.9)	0
CFP	107 (93)	1 (1)	7 (6)	16 (23.5)	15 (22)	37 (54.4)

SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, GN: Gentamisin, IMP: İmipenem, CIP: Siprofloksasin, TE: Tetrasiklin, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, CFP: Sefoperazon.

Tartışma

Nazokomiyal infeksiyonlarda ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde metisiline dirençli stafilkoklarla gelişen ağır infeksiyonlar halen önemini koruyan bir sağlık sorunudur. Günümüzde, MSSA'ların etken olduğu infeksiyonların tedavisinde beta-laktam antibiyotikler kullanılabildiği halde, MRSA'ya bağlı olarak gelişen infeksiyonların tedavisinde ise glikopeptid grubu antibiyotikler ilk seçenek olmaktadır [7]. Ancak son yıllarda glikopeptidlere karşı duyarlılığı azalmış ve dirençli MRSA izolatları da bildirilmektedir [8, 9]. Glikopeptid grubu antibiyotiklere ilişkin maliyet ve yan etkiler de dikkate alındığında diğer grup antibiyotiklerin MRSA taşımaktadır [10].

Disk difüzyon testi, kolay ve hızlı sonuç veren bir yöntem olarak bir çok klinikte metisilin direncinin saptanmasında kullanılmaktadır. Çalışmamızda metisiline direncin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi ile birlikte E-testi de kullanılmış ve elde edilen bulgular MRSA'ların belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi sonuçlarının E-testi ile de doğrulanmasının daha güvenli olduğunu göstermiştir. Özellikle disk difüzyon testinde orta seviyede duyarlılık gösteren 8 izolatın E-testi ile MSSA olduğu belirlenebilmiştir (Şekil 1). Üçüncü kuşak bir sefalosporin olan sefoperazona karşı çalışmamızda sefalosporin olan seftriakson için MRSA'larda bildirilen direnç oranına baktığımızda seftriaksona da %93.1 [15] ve %98 [17] oranlarında yüksek direnç saptadığı görülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan MRSA izolatlarında test edilen antibiyotikler arasında en etkili antibiyotiklerin %88.7 duyarlılık oranıyla trimetoprim-sulfametoksazol olduğu görülmüştür. Saptamış olduğumuz %11.3'lük trimetoprim-sulfametoksazol direnç oranı, bazı çalışmalarda elde edilen %7 [11], %6.5 [14], % 5 [18], %6 [19] ve %2.2 [20] oranlarından nispeten yüksek olmakla birlikte hala MRSA infeksiyonlarında etkili

olabileceğini ortaya koyması bakımından önemlidir. Öte yandan yine ulusal çalışmalardan bazılarında ise MRSA'larda %25-64 arasında değişen oranlarda trimetoprim-sulfametoksazol direnci bildirmektedir [12, 13, 15-17].

Jones ve arkadaşları 2003 yılında yayımlanan kapsamlı çalışmalarında A.B.D., Fransa, Almanya, İtalya ve İspanya'da 2001 yılı süresince deri ve yumuşak doku infeksiyonu klinik örneklerinden elde edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılığını saptamışlardır [21]. Bu çalışmada söz konusu ülkelerde *S. aureus*'un en yaygın patojenlerden biri olduğu ve A.B.D.'de *S. aureus*' lar da metisiline direnç oranları dünya genelinde değişkenlik göstermektedir ve ülkemizde 1997'den günümüze kadar çeşitli çalışmalarda bildirilen MRSA oranları %20.6 ile %100 arasındadır. Bizim çalışmamızda ise metisilin direnç oranının %63 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Metisilin direnci çoklu antibiyotik direncinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir ve çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular da bu görüşü destekler nitelikte olup MRSA'larda gentamisin, imipenem, siprofloksasin, tetrasiklin, amoksisilin-klavulanik asit ve sefaperozon için yüksek oranlarda direnç saptanmıştır (Çizelge 1). Çalışmamızda MRSA'larda en yüksek direnç benzer çalışmaların sonuçları Çizelge 2'de gösterilmiştir. Bu çalışmalarda MRSA için siprofloksasine %32-96.8 arasında değişen oldukça geniş bir direnç aralığı bildirilmektedir [11-16]. Gentamisine karşı saptanan direnç oranları %21-100 arasında değişmektedir [11-14,16-18]. Çalışmamızda ise gentamisine de %92.3 gibi yüksek bir direnç oranı saptanmıştır. %84.3 oranında direnç tespit ettiğimiz tetrasiklin ile ilgili olarak da diğer çalışmalarda %26-85 oranlarında direnç bildirilmektedir [11-13,17]. MRSA izolatlarında %63 oranında direnç saptadığımız imipenem için ise %88 ve %18 oranında direnç rapor edilmektedir [13,17].

Çizelge 2. Çeşitli çalışmalarda *S. aureus* 'ların metisiline ve MRSA 'ların diğer antibiyotiklere direnç oranları (%).

Araştırmacılar	Antibiyotikler								
	OX	SXT	GN	IMP	CIP	TE	AMC	CFP	CRO
Gedik ve ark (11)	100	7	98						
Diler, Kocabeyoğlu (12)	30	25	27		91	85			
Mamal-Torun ve ark (13)	70.6	64	76	18	32	65			
Sancak, Günalp (14)	58.5	6.5	100		69	72			
Özkalp, Baybek (15)	20.6	37.9			96.8				
Ertek ve ark (16)		60.4	77.1		34.5				
Mamal-Torun ve ark (17)	71	33	21	88	82.3				93.1
Öngen ve ark (18)	27.7	5	91			26			98
Arıkan, Tunçkanat (19)	52.7	6							
Memikoğlu ve ark (20)		2.2							
Bu çalışma	63	11.3	92.3	63	96	84.3	93		93

OX: Oksasilin, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, GN: Gentamisin, IMP: İmipenem, CIP: Siprofloksasin, TE: Tetrasiklin, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, CFP: Sefoperazon, CRO: Seftriakson.

%44.4, Fransa'da %34.7, Almanya'da %12.4, İtalya'da %41.8 ve İspanya'da da %32.4 oranında MRSA tespit edildiği bildirilmiştir. Bu beş ülkede siprofloksasin ve amoksisilin-klavulanik asite %83.9-100, gentamisine %20.4-87 ve seftriaksona ise %98.7-100 arasında değişen yüksek oranda direnç saptanmıştır. Trimetoprim-sulfametoksazol için bildirilen en yüksek direnç oranı ise %15.9'dur.

Jones ve arkadaşlarının bulgularının ve bizim çalışmamızda söz konusu antibiyotikler ile ilgili olarak saptadığımız değerlerin birbirine benzer olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda test edilen çeşitli antibiyotikler arasında MRSA suşlarında trimetoprim-sulfametoksazole direnç

oranının düşük olması dikkat çekicidir. Bu bulgu trimetoprim-sulfametoksazolün yalnız MSSA infeksiyonlarında değil, aynı zamanda ciddi olmayan MRSA infeksiyonlarında ve özellikle glikopeptidlerin kullanılmadığı durumlarda antibiyogram sonuçları dikkate alınmak kaydı ile etkin bir antibiyotik olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirebilen MRSA'larda halen tek tedavi seçeneği olan glikopeptidlere karşı da direnç gelişmeye başladığı göz önüne alınarak en azından bu direncin yaygınlaşmasını önlemek açısından mevcut antibiyotikler içinde *in vitro* etkinliği yüksek olan trimetoprim-sulfametoksazolün klinik etkinliğinin değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Kaynaklar

- [1] Thompson, RL, Cabezudo, I, RP, Wenzel, 1982. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann. Intern. Med. 97 309-317.
- [2] Yıldız O, Aygen B, 2002. Lokokların antibiyotik duyarlılıkları ve direnç sorunu. İnfeksiyon Hastalıkları Serisi 5, 128-136.
- [3] Ehlert K, 1999. Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* - molecular basis, novel targets and antibiotic therapy. Curr. Pharm. Des. 5. 45-55.
- [4] Koneman EW, Allen SD, Janda WD, 1997. Schreckenberger P.C., Winn W.C., Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5. baskı, Lippicott, New York.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards: 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard, M2-A6, NCCLS, Wayne.
- [6] National Committee for Clinical Laboratory Standards: 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS Document M100-S12. 11th Informational Suppl. NCCLS, Wayne.
- [7] Schito G, Auckenthaler R, Marchese A, Bauernfeind A, 1999. European survey of glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus* spp. Clin. Microbiol. Infect. 5, 547-553.
- [8] Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Oguri T, Tenover FC, 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother. 40. 135-136.
- [9] Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori, YS, 1997. Fukuchi, I, Kobayashi, Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 350. 1670-1673.
- [10] Johnson AP, 1998. Intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a major threat or a minor inconvenience. J. Antimicrob. Chemother. 42. 289-291.
- [11] Gedik H, Benzonana N, Taşer B, Ersöz G, Özer S, 1997. Homojen MRSA suşlarında antibiyotik direnci. Ankem Derg. 11 (4). 457-460.
- [12] Diler M, Kocabeyoğlu Ö, 1998. Değişik kaynaklardan izole edilen 1200 stafülokok suşunun türlerine ve metisilin direncine göre dağılımı ile beta-laktam dışı bazı antibiyotiklere duyarlılık oranları. Klimik Derg. 11 (3). 112-115.
- [13] Mamal-Torun M, Bahar H, Yüksel P, Aklan EE, Altınkum S, 1999. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafülokok kökenlerine karşı fusidik asidin *in vitro* etkinliği. Ankem Derg. 13 (2). 103.
- [14] Sancak B, Günalp A, 2000. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının mupirosin ve diğer antibiyotiklere olan duyarlılıkları. Mikrobiyol. Bült. 34. 209-213.
- [15] Özkalp B, Baybek H, 2003. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere *in vitro* duyarlılıkları. Genel Tıp Derg. 13 (2). 65-68.
- [16] Ertek M, Yazgı H, Aktaş E, Ayyıldız M, Parlak A, 2003. Metisiline dirençli stafülokokların linezolid ve diğer bazı antimikrobiyal ajanlara duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol. Bült. 37 (4) 235-240.
- [17] Mamal-Torun M, Bahar H, Özcan N, Yüksel P, 1998. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilen *Staphylococcus aureus* kökenlerinin çeşitli antimikrobiklere direnç durumları. Ankem Derg. 12 (2). 103.
- [18] Öngen B, Otağ F, Gürler N, Töreci K, 2000. Klinik örneklerden izole edilen stafülokok suşlarında fusidik asit ve diğer antimikrobik maddelere direnç. Ankem Derg. 14 (1). 36-38.
- [19] Arıkan S, Tunçkanat F, 2000. Hacettepe Üniversitesi hastanesinde 1993 yılından bu yana izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının trimetoprim-sulfametoksazole *in vitro* duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol. Bült. 34 223-232.
- [20] Memikoğlu KO, Bayar B, Kurt Ö, Çokça F, 2002. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının fusidik asit ve trimetoprim-sulfametoksazole *in vitro* duyarlılığı. Mikrobiyol. Bült. 36 (2) 141-145.
- [21] Jones ME, Karlowsky JA, Draghi DC, Thornsberry C, Sahn DF, Nathwani D, 2003. Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing skin and soft tissue infections in the USA and Europe: a guide to appropriate antimicrobial therapy. Int. J. Antimicrob. Agents 22 (2003) 406-419.

