

STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA NİKLOZAMİDİN MUPİROSİN İLE *IN VİTRO* SİNERJİSTİK ETKİSİNİN TARAMA TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Merve CİHAN, Arif KAYGUSUZ

M. Cihan: 0000-0002-0075-051X, A. Kaygusuz: 0000-0002-1404-1933

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZ

Staphylococcus aureus taşıyıcılarında kullanılan antibiyotiklere direncin artması alternatif tedavi arayışını gündeme getirmiştir. Bu araştırma ile *S. aureus* izolatlarında niklozamidin mupirosin ile *in vitro* sinerjistik etkisinin olup olmadığının incelenmesi hedeflenmiştir. 2021 yılında laboratuvarımıza gönderilen örneklerden 25 metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) ve 25 metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatı toplanmıştır. İzolatlarda çift disk sinerji yöntemi uygulanarak niklozamid ile mupirosin arasında *in vitro* sinerjistik etki olup olmadığı incelenmiştir.

Çalışmada test edilen izolatlarda iki antimikrobiyal ilaç arasında herhangi bir sinerji saptanmamıştır. İzolatların sadece MRSA grubundaki iki tanesinde mupirosine direnç gözlenmiş olup, diğer izolatların tümünün mupirosine duyarlı olduğu bulunmuştur. *S. aureus* izolatlarında niklozamidin mupirosin ile *in vitro* sinerjistik etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: mupirosin, niklozamid, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Investigation of *In Vitro* Synergistic Effect of Niclosamide with Mupirocin in *Staphylococcus aureus* Strains by Screening Test

Increasing resistance to antibiotics used in *Staphylococcus aureus* carriers has brought up the search for alternative treatment. With this research it was aimed to examine whether niclosamide has an *in vitro* synergistic effect with mupirocin in *S. aureus* isolates. 25 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and 25 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolates were collected from the samples sent to our laboratory in 2021. *In vitro* synergistic effect between niclosamide and mupirocin was investigated by applying double disc synergy method in isolates.

No synergy was detected between the two antimicrobial drugs in the isolates tested in the study. Mupirocin resistance was observed in only two of the isolates in the MRSA group, and all other isolates were found to be susceptible to mupirocin. No *in vitro* synergistic effect of niclosamide with mupirocin was observed in *S. aureus* isolates.

Keywords: mupirocin, niclosamide, *Staphylococcus aureus*

İletişim adresi: Merve Cihan. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

GSM: (0538) 646 36 92

e-posta: mervecihan54@hotmail.com

Alındığı tarih: 31.05.2022, Yayına Kabul: 29.07.2022

Received/Geliş: 31.05.2022 Accepted/Kabul: 29.07.2022 Published Online/Online Yayın: 31.08.2022

Atf/Cite as: Cihan M, Kaygusuz A. *Staphylococcus aureus* suşlarında niklozamidin mupirosin ile *in vitro* sinerjistik etkisinin tarama testi ile araştırılması. ANKEM Derg. 2022;36(2):59-63.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus, hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların en sık sebeplerinden biri olup^(3,12) bakteriyemi ve sepsise yol açması nedeniyle önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir^(1,8). İnsanlarda *S. aureus*'un primer rezervuarı burundur^(14, 18).

S. aureus'un nazal taşıyıcılığı, enfeksiyonun epidemiyolojisinde ve patogeneğinde kilit bir rol oynar ve hem toplum kökenli hem de nozokomiyal (hastane kökenli) enfeksiyonların gelişimi için önemli bir risk faktörüdür⁽³⁰⁾. Bu enfeksiyonların ve olası sonuçlarının önlenmesi sağlık sistemi ve ekonomi için büyük önem taşımaktadır⁽²⁴⁾. Önleme stratejilerinden biri, özellikle belirli hasta gruplarında yapılması önerilen nazal dekolonizasyondur^(17,26,29).

Hastalarda ve sağlık personelinde *S. aureus* nazal taşıyıcılığında klorheksidin ve mupirosin önerilmektedir⁽¹¹⁾. Mupirosin bakteriyel izolösil transfer RNA sentetazı inhibe edip protein ve RNA sentezini engelleyerek etki gösterir⁽²¹⁾. Mupirosinin uzamış ve kontrolsüz kullanımı sonucu zamanla mupirosine dirençli *S. aureus* suşları ortaya çıkmıştır⁽²⁰⁾. Türkiye'de yapılan bir çalışmada Türkiye'deki hastane kaynaklı *S. aureus* izolatlarında mupirosin direnci yüksek (%45) bulunmuştur⁽²⁵⁾. Tüm dünyada mupirosine karşı direncin giderek artması⁽¹³⁾ mupirosin ile çeşitli ajanların beraber kullanımını gündeme getirmiştir. Çünkü sinerjistik etki ile duyarlı bir bakteri ile oluşmuş enfeksiyona karşı tedavi yanıtını artırmak ya da tedavi sırasında direnç gelişimini yavaşlatmak mümkün olabilmektedir.

Belirli hastalıkların tedavisi için kullanılmakta olan ilaçların, başka hastalıkların tedavisi için kullanımı günümüzde yeni bir araştırma alanı olmuştur. Bu konudaki çalışmalar sonucunda, antihelmintik bir ilaç olan niklozamidin antimikrobiyal etkisinin olduğu bulunmuştur^(9,23). Niklozamidin *S. aureus* suşlarına etki mekanizması ise bilinmemektedir^(9,23). Niklozamidin antibakteriyel etkileri üzerine yapılan çalışmalar çok az sayıdadır. Yapılan bir çalışmada niklozamidin metisilin dirençli *S. aureus*'a (MRSA) karşı güçlü *in vitro* ve *in vivo* etkinlik gösterdiği ve MRSA tedavisinde vankomisin kadar etkili olduğu bulunmuştur⁽²³⁾. Başka bir çalışmada niklozamidin hastane kaynaklı yabancı cisim enfeksiyonlarına karşı antimikrobiyal yüzey koruması oluşturduğu, yüzeylere tutunan stafilokokları çok düşük konsantrasyonlarda etkisiz hale getirdiği ve biyofilm oluşumunu önlediği gösterilmiştir⁽⁹⁾.

Mupirosin ve niklozamid arasında sinerji araştıran çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda niklozamidin hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenlerinden biri olan *S. aureus*^(3,12) üzerinde mupirosin ile *in vitro* sinerjistik etkisi araştırılmıştır.

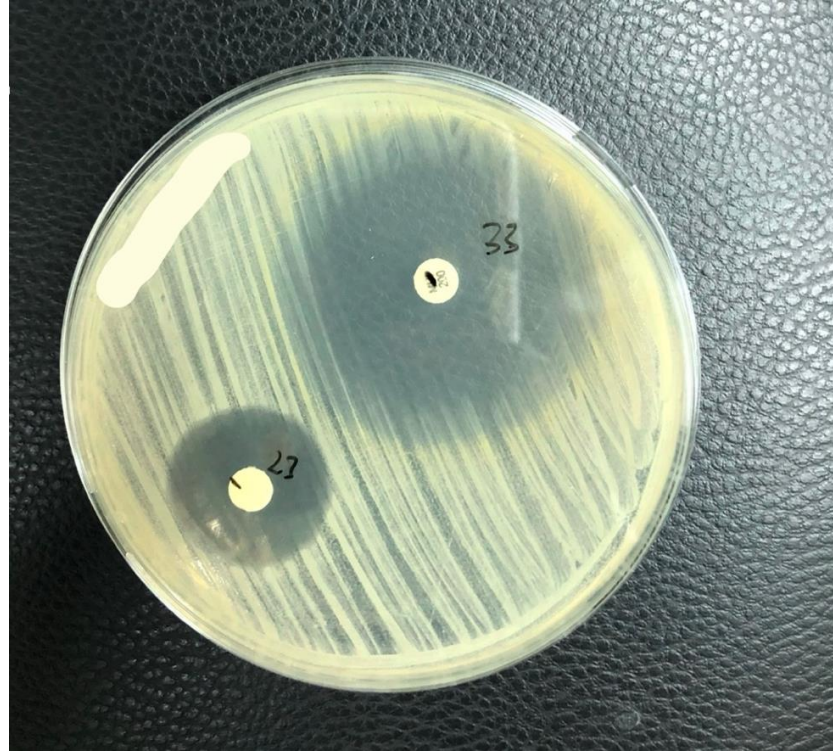
GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa - Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na farklı hastalardan gelen ve konvansiyonel yöntemlerle (koagülaz pozitif Gram pozitif kok) *S. aureus* olarak tanımlanan izolatların metisilin direnci sefoksitin diski ile belirlenmiştir⁽²⁷⁾. Örneklerden 25 metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) ve 25 MRSA izolatı toplanıp saf kültürü alındıktan sonra çalışma gününe kadar -80°C'de Brucella buyyon besiyeri içerisinde saklanmıştır.

Firma önerileri doğrultusunda niklozamid (Medchemexpress, Amerika Birleşik Devletleri) DMSO (dimetil sülfoksit) içinde çözündürülmüştür⁽¹⁹⁾. Sonrasında 10, 25, 50 ve 60 µg niklozamid içeren diskler ile *S. aureus* ATCC 29213 standart suşu kullanılarak yaklaşık 25-30 mm zon çapı oluşturan konsantrasyon (60 µg) bulunmuştur⁽²⁸⁾. Daha sonra boş antibiyogram disklerine her diske 60 µg niklozamid içeren 18.3 µl solüsyon pipet yardımıyla emdirilmiştir ve 2-3 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan diskler çalışma gününe kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Dondurulmuş bakteri izolatları iki kez kanlı agarda pasaj ile üretildikten sonra, kolonilerden 0.5 McFarland yoğunluğundaki süspansiyonlar hazırlanarak Mueller-Hinton agara eküvyon yardımıyla yayılmıştır. Niklozamid (60 µg) ve mupirosin (200 µg) diskleri yapılan deneylerde; diskler, aralarında 25, 30, 35 ve 40 mm mesafe olacak şekilde yerleştirilip incelenmiş ve mupirosin ile niklozamid emdirilmiş disklerin disk difüzyon yöntemiyle inhibisyon zonu oluşturduğu ortalama mesafe ölçülüp yarıçapları toplanarak uygun uzaklık araştırılmıştır. Sinerjinin incelenebileceği diskler arası en iyi mesafe olduğu için, deneylerde diskler arasında 40 mm mesafe olacak şekilde yerleştirilmiştir. İzolatlar 35°C'lik etüvde bir gece (16-24 saat) inkübe edilmiştir. Bu şekilde ilaçların sinerjistik etkisi çift disk sinerji yöntemiyle incelenmiştir⁽²⁸⁾. Kalite kontrol suşları olarak *S. aureus* ATCC 29213 ve ATCC 43300 standart suşları kullanılmıştır.

İzolatların ve standart suşların niklozamid ve mupirosin inhibisyon zonları ölçülüp kaydedilmiştir. Mupirosin direnci EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) önerilerine göre belirlenmiştir⁽²⁷⁾. Niklozamid ve mupirosin diskleri arasında köprüleşme veya inhibisyon zonu olup olmadığı incelenmiştir. Niklozamid zon çaplarının dağılımı için tanımlayıcı istatistik yapılmıştır.



Şekil 1. Mupirosin ve niklozamid diskleri ile yapılan çift disk sinerji testi sonucu (18 numaralı izolat).

Tablo 1. MSSA ve MRSA suşlarında niklozamid zon çaplarının suş sayısına göre dağılımı.

Niklozamid zon çapı	17 mm	18 mm	20 mm	21 mm	22 mm	23 mm	24 mm	25 mm	26 mm	27 mm	28 mm
İzolat sayısı (n)	1	1	1	1	4	8	7	12	8	4	5

Not: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşunun niklozamid zon çapı: 24 mm, *S.aureus* ATCC 43300 suşunun zon çapı: 25 mm ölçülmüştür.

TARTIŞMA

Mupirosinin *S. aureus*'un nazal eradikasyonu için en başarılı topikal antibiyotiklerden biri olduğu gösterilmiştir⁽²²⁾. Tüm dünyada mupirosine karşı direncin giderek artması⁽¹³⁾ mupirosin ile çeşitli ajanların beraber kullanımını gündeme getirmiştir. Beraber kullanımda olumlu yanıt alınırsa sinerjistik etki ile tedavi başarısı artacak ve mupirosine direnç gelişiminin önüne de geçilebilecektir.

MSSA ve MRSA suşlarıyla yapılan bir çalışmada mupirosinin amoksisilin-klavulanik asit ile sinerjistik etki gösterdiği, sıçan modelinde vasküler greft enfeksiyonuna karşı profilakside kombinasyon şeklinde uygulandığında tek başına mupirosine göre daha büyük ölçüde enfeksiyonu inhibe ettiği bulunmuştur⁽⁶⁾.

MRSA suşlarında dama tahtası yöntemiyle yapılan bir çalışmada gentamisin mupirosin aktivitesini artırdığı gözlenmiştir⁽¹⁶⁾.

MSSA, MRSA ve mupirosine dirençli *S. aureus* suşlarında yapılan bir çalışmada fare modelinde mupirosinin neomisin ile kombinasyon kullanımının (1.7-log azalma) *S. aureus* kolonizasyonunu tek başına mupirosin (1.1-log azalma) kullanımına göre daha fazla azalttığı gözlenmiştir⁽²⁾.

MSSA ve MRSA suşları üzerinde küçük kinolon türevi bir bileşik olan HT61 bileşiği ile yapılan bir çalışmada MSSA ve MRSA suşları üzerinde mupirosin ile *in vitro* sinerjistik etki görülmesi de fare modelinde yapay olarak oluşturulan cilt enfeksiyonunda *in vivo* topikal mupirosin ile kombinasyon kullanımında tek başına mupirosin kullanımına ve plasebo kontrol grubuna kıyasla bakteri sayısında belirgin azalma (~5 log) sağladığı bulunmuştur⁽¹⁰⁾.

Antibiyotikler arasındaki sinerji ve antagonizma gibi önemli olabilecek etkileşimler dama tahtası ve zamana bağlı öldürme yöntemleri gibi kantitatif ve daha doğru sonuç veren testlerle araştırılır. Ancak bu testler komplike ve zaman alıcıdır. Daha kolay ve uygulanabilir olan disk yaklaşım (disk approximation) testleri bu etkileşimleri saptamak için tarama amaçlı olarak kullanılmaktadır. Sinerjistik etkiyi saptayan testler çift disk sinerji testi adı ile genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) saptanmasında, antagonist etkiyi saptayan testler D zon testi adı ile eritromisin ve klindamisin

arasındaki antagonistik etkiyi saptamada yaygın şekilde kullanılmıştır^(5,28). GSBL oluşturan bakterileri saptamak için kullanıldığında çift disk sinerji testinin çeşitli çalışmalarda sensitivitesi %83-95, spesifitesi %76-100, pozitif prediktif değeri %84-100 ve negatif prediktif değeri %78-92 olarak bulunmuştur^(4,7). Bu çalışmada maddi ve zamansal kaygılar güdüldüğü için çift disk sinerji yöntemi tercih edilmiştir.

Bu araştırma niklozamidin mupirosin ile *in-vitro* sinerjistik etkisinin olup olmadığını incelemeyi hedeflemiştir. Sinerjistik etki bulunması durumunda nazal *S. aureus* taşıyıcılarında mupirosin-niklozamid kombinasyonu kullanımı konusunda yeni çalışmalara öncülük edebileceği düşünülmüştür. Ancak böyle bir sinerji bulunamamıştır.

Etik Kurul Onayı: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulu'ndan 08.03.2021 tarih, 45729 sayılı yazı ile alınmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2021-35725).

Ethics Committee Approval: It was obtained from the Clinical Research Ethics Evaluation Committee of Istanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, with the letter dated 08.03.2021 and numbered 45729.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial support: The study was supported by Istanbul University Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Rectorate Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: TTU-2021-35725).

KAYNAKLAR

1. Benfield T, Espersen F, Frimodt-Moller N et al. Increasing incidence but decreasing in-hospital mortality of adult Staphylococcus aureus bacteraemia between 1981 and 2000. Clin Microbiol Infect. 2007;13(3):257-63.
2. Blanchard C, Brooks L, Beckley A, Colquhoun J, Dewhurst S, Dunman PM. Neomycin sulfate improves the antimicrobial activity of mupirocin-based antibacterial ointments. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(2):862-72.
3. Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Infect Dis. 2008;46(Suppl 5):S344-9.
4. Chowdhury AHMSK, Nandi S, Rahman M, et al. Comparison between phenotypic confirmatory test & double disc synergy test in detection of extended spectrum b-lactamases producers among gram-negative bacilli. CMOSHMC Journal. 2017;15(2):3-8.
5. Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2003;41(10):4740-4744.
6. Ghiselli R, Giacometti A, Goffi L et al. Prophylaxis against Staphylococcus aureus vascular graft infection with mupirocin-soaked, collagen-sealed dacron. J Surg Res. 2001;99(2):316-20.
7. Giriyaapur RS, Nandihal NW, Krishna BV, Patil AB, Chandrasekhar MR. Comparison of disc diffusion methods for the detection of extended-spectrum beta lactamase-producing enterobacteriaceae. J Lab Physicians. 2011;3(1):33-6.
8. Gottlieb GS, Fowler VG Jr, Kong LK et al. Staphylococcus aureus bacteremia in the surgical patient: a prospective analysis of 73 postoperative patients who developed Staphylococcus aureus bacteremia at a tertiary care facility. J Am Coll Surg. 2000;190(1):50-7.
9. Gwisai T, Hollingsworth NR, Cowles S et al. Repurposing niclosamide as a versatile antimicrobial surface coating against device-associated, hospital-acquired bacterial infections. Biomed Mater. 2017;12(4):045010.
10. Hu Y, Coates AR. Enhancement by novel anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus compound HT61 of the activity of neomycin, gentamicin, mupirocin and chlorhexidine: in vitro and in vivo studies. J Antimicrob Chemother. 2013;68(2):374-84.
11. Huang SS, Singh R, McKinnell JA et al. Decolonization to reduce postdischarge infection risk among MRSA carriers. N Engl J Med. 2019;380(7):638-50.
12. Jones RN. Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). Semin Respir Crit Care Med. 2003;24(1):121-34.

13. Khoshnood S, Heidary M, Asadi A et al. A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against *Staphylococcus aureus*. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:1809-18.
14. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(3):505-20.
15. Laishram S, Pragasam AK, Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B. An update on technical, interpretative and clinical relevance of antimicrobial synergy testing methodologies. *Indian J Med Microbiol*. 2017;35(4):445-68.
16. LaPlante KL. In vitro activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57(4):413-8.
17. Levy PY, Ollivier M, Drancourt M, Raoult D, Argenson JN. Relation between nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and surgical site infection in orthopedic surgery: the role of nasal contamination. A systematic literature review and meta-analysis. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2013;99(6):645-51.
18. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*. 1998;339(8):520-32.
19. medchemexpress. Niclosamide, <https://www.medchemexpress.com/Niclosamide.html> Erişim tarihi:01.12.2021
20. Miller MA, Dascal A, Portnoy J, Mendelson J. Development of mupirocin resistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after widespread use of nasal mupirocin ointment. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996;17(12):811-3.
21. Parenti MA, Hatfield SM, Leyden JJ. Mupirocin: a topical antibiotic with a unique structure and mechanism of action. *Clin Pharm*. 1987;6(10):761-70.
22. Poovelikunnel T, Gethin G, Humphreys H. Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(10):2681-92.
23. Rajamuthiah R, Fuchs BB, Conery AL et al. Repurposing salicylanilide anthelmintic drugs to combat drug resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124595.
24. Sakr A, Bregeon F, Rolain JM, Blin O. *Staphylococcus aureus* nasal decolonization strategies: a review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(5):327-40.
25. Sareyyupoglu B, Ozyurt M, Haznedaroglu T, Ardic N. Detection of methicillin and mupirocin resistance in staphylococcal hospital isolates with a touchdown multiplex polymerase chain reaction. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008;53(4):363-7.
26. Schweizer M, Perencevich E, McDanel J et al. Effectiveness of a bundled intervention of decolonization and prophylaxis to decrease Gram positive surgical site infections after cardiac or orthopedic surgery: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2013;346:f2743.
27. Testing TECoAS. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters 2021, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf Erişim tarihi: 30.11.2021
28. Turnidge JD and Bell JM. Antimicrobial Susceptibility on Solid Media, "Amsterdam D (eds): Antibiotics in Laboratory Medicine, 6.baskı" kitabında s. 44-88, Wolters Kluwer Health (2015).
29. van Rijen MM, Bonten M, Wenzel RP, Kluytmans JA. Intranasal mupirocin for reduction of *Staphylococcus aureus* infections in surgical patients with nasal carriage: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(2):254-61.
30. Yazgi H, Ertek M, Ozbek A, Kadanali A. [Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in hospital personnel and the normal population and antibiotic resistance of the isolates]. *Mikrobiyol Bul*. 2003;37(2-3):137-42.