

STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA VANKOMİSİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF VANCOMYCIN RESISTANCE AMONG STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS

Alpay AZAP¹

Funda ERGİN TİMURKAYNAK²

Emine KURU İNCİ²

Hande ARSLAN²

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı;

² Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı; Ankara

Anahtar Sözcükler: *Staphylococcus aureus*, vankomisin, *in vitro* direnç, vankomisin agar tarama yöntemi

Key Words: *Staphylococcus aureus*, vancomycin, *in vitro* resistance, vancomycin agar screening method

ÖZET

Stafilokokların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde giderek artan oranda vankomisin kullanılması, bu bakterilerde vankomisin duyarlılığının azalmasına neden olmuştur. Bu çalışmada, vankomisin kullanımının yüksek olduğu Başkent Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisin direncinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, farklı hastalardan izole edilen 145 *Staphylococcus aureus* suşu 6 µg/mL vankomisin içeren beyin-kalp infüzyor agara inoküle edilmiş, 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra üreme açısından değerlendirilmiştir. Sonuçta, vankomisine azalmış duyarlılık gösteren *S. aureus* suşuna rastlanmamıştır. Hastanede yaygın vankomisin kullanımına karşın azalmış duyarlılık gösteren suşa rastlanmaması sevindiricidir.

SUMMARY

Excessive use of vancomycin causes a decrease in susceptibility of staphylococci to this drug by means of treatment pressure. The aim of this study was to evaluate vancomycin resistance among *Staphylococcus aureus* strains isolated at a tertiary care hospital at which there is a high vancomycin consumption. One hundred and forty-five isolates were screened by vancomycin (6 µg/ml) containing brain-heart infusion agar incubated for 24 and 48 hours. No vancomycin resistant *S. aureus* was detected. In spite of widespread use of vancomycin in the hospital fortunately no resistant *S. aureus* strain was detected.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus hem toplumda edinilmiş hem de hastane kökenli infeksiyonlara neden olabilen mikro-organizmaların başında gelmektedir. Bindokuzyüzsek-senli yılların başından itibaren *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin yaygınlaşmasıyla birlikte, bu suşların neden olduğu ciddi infeksiyonların tedavisinde yaygın bir şekilde vankomisin kullanılmaya başlanmıştır (1). Vankomisin kullanımının yaygınlaşması, vankomisine duyarlılığı azalmış *S. aureus* suşlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Vankomisine duyarlılığı azalmış ilk suş 1996

yılında Japonya'dan bildirilmiştir (2). Bunu Amerika Birleşik Devletleri (3), Avrupa (4) ve Kore'den (5) bildirilen suşlar izlemiştir. NCCLS kriterlerine göre (6); vankomisin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ≤ 4 ng/ml olan suşlar vankomisine duyarlı, 8-16 ng/ml olan suşlar orta duyarlı (VISA-Vancomycin Intermediate *S. aureus*) ve ≥ 32 ng/mL olan suşlar vankomisine dirençli kabul edilmektedir (6).

Stafilokoklarda vankomisine azalmış duyarlılığı gösteren bir tanım da heterorezistan VISA (hVISA) tanımıdır. hVISA, vankomisine duyarlı (MİK ≤ 4 ng/mL) olan *S. aureus* suşunun oluşturduğu bakteri topluluğunun içinde MİK

değeri 2-8 kat yüksek olan bakterilerin bulunmasıdır (7). Bu türden azalmış duyarlılığı saptamak için daha yüksek miktarda inokulum (10^8 cfu/ml) yapılması, inkübasyon süresinin uzatılması ve daha düşük (MİK 4 ng/ml) düzeyde vankomisin içeren tarama besiyerinin kullanılması gerekmektedir. Ancak hVISA sıklığının düşük olduğu (%0.5-1.5) bildirilmekte ve bu suşların klinik öneminin ne olduğu henüz bilinmemektedir (7).

Bugüne kadar bildirilen VISA suşlarının büyük çoğunluğu, kateter veya protez enfeksiyonu nedeniyle uzun süre vankomisin tedavisi görmüş KBY'li hastalardan izole edilen ve aynı zamanda metisiline dirençli olan *S. aureus* suşlarıdır (7). Metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarının vankomisine direnç geliştirip geliştirmediği tartışma konusu olmakla birlikte, yakın zamanda Amerika Birleşik Devletleri (3) ve Fransa'dan (8) bildirilen VISA suşları metisiline duyarlıdır.

Yazarların çalıştığı hastane; 467'si hemodiyaliz, 180'i ise CAPD programında olmak üzere kronik böbrek yetmezlikli (KBY) 647 hastanın düzenli olarak izlendiği ve protez veya kateter enfeksiyonu nedeniyle vankomisinin yaygın kullanıldığı 289 yataklı bir merkezdir. Bu çalışmada, *S. aureus* suşlarında vankomisin direncini ve metisiline duyarlılığının bu direnç üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Heterodirenç sıklığının düşük olması nedeniyle çalışmada hVISA suşlarının varlığı araştırılmamıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Ocak 2001-Kasım 2001 tarihleri arasında 64'ü KBY hastalarından olmak üzere farklı hastalardan izole edilen 145 *S. aureus* suşu alınmıştır. Tüp koagülaz testi ile *S. aureus* oldukları belirlenen stafilokok suşlarının metisilin duyarlılığı NCCLS kriterleri doğrultusunda, 1 ng oksasilin diski kullanılarak 35° C'de 24 saat inkübasyon sonrasında belirlenmiştir. Yüz kırk beş kökenin 67'si metisiline dirençli bulunmuştur. Kanlı agarda 24 saat inkübe edilen *S. aureus* suşlarından hazırlanan 0.5 McFarland'lık süspansiyondan pipetle 10 ml alınarak laboratuvarında hazırlanan 6 ng/mL vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agara (brain heart infusion agar-BHIA) ekilmiştir (9). Plaklar 35° C'de inkübe edilerek 24 ve 48. saatlerde değerlendirilmiştir. Kontrol kökenleri olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (vankomisine dirençli) ve *S. aureus* ATCC 29213 (vankomisine duyarlı) kullanılmıştır.

BULGULAR

Farklı hastalardan izole edilen 145 *S. aureus* suşunun 34'ü kandan, 26'sı solunum sisteminden, 18'i periton diyaliz sıvısından, 18'i üriner sistemden ve 49'u diğer vücut bölgelerinden izole edilmiştir. Kırksekiz saatlik

inkübasyon sonucunda 6 ng/mL vankomisin içeren BHIA plaklarında vankomisine dirençli *E. faecalis* ATCC 51299 kontrol suşu dışında üreme saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Vankomisine dirençli ilk enterokok suşunun 1988'de bildirilmesi tıp dünyasında yoğun bir ilgiye neden olmuştur. Noble ve arkadaşlarının 1992'de enterokoklarda vankomisin direncinden sorumlu genlerden biri olan vanA genini laboratuvar ortamında enterokoklardan *S. aureus*'a aktarmayı başarmaları ilgiyle birlikte kaygı ile karşılanmıştır (9). Ancak bugüne kadar *in vivo* koşullarda vankomisin direnç genlerinin stafilokoklara geçtiği gösterilmemiştir (9, 10). Stafilokoklarda vankomisine direnç gelişimi, başka mikro-organizmalardan gen aktarımı veya stafilokokların diğer bazı antibiyotiklere direnç geliştirmesinde görüldüğüne benzer şekilde küçük varyant kolonilerden kaynaklanmaz (9). Stafilokoklarda azalmış glikopeptit duyarlılığı, yaygın glikopeptit kullanımının direnç seçimine neden olmasına bağlıdır (tedavi basıncı) (9). Nitekim, *in vitro* koşullarda vankomisin konsantrasyonunun giderek artırılması ile glikopeptitlere dirençli *S. aureus* mutantları elde edilebilmektedir (11). Yine bunu destekler şekilde, bugüne kadar izole edilmiş olan VISA suşlarının hemen tamamı, son 3-6 ay içinde uzun süreli (6-18 hafta) vankomisin tedavisi gören hastalardan izole edilmiştir (7). Ancak bunun aksine yayınlar da vardır. Örneğin, daha önce vankomisin kullanmamış olan ve konjunktivit nedeniyle ayaktan izlenen bir hastada etken olarak izole edilen *S. aureus* suşunun vankomisine dirençli, metisiline duyarlı olduğu bildirilmiştir (8). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2002 yılında iki hastada hem metisiline hem de vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşları izole edilmiştir ve bu hastaların birinde eş zamanlı vankomisine dirençli enterokok (VRE) enfeksiyonu da saptanmıştır (12, 13). Ancak bu suşlardaki vankomisin direnç mekanizması henüz aydınlatılamamıştır.

Hemodiyaliz veya periton diyalizi programındaki KBY'li hastalar, stafilokokların neden olduğu tekrarlayan santral venöz katater veya protez enfeksiyonları nedeniyle sık sık ve uzun süre vankomisin tedavisine gereksinim duydıklarından risk altındadırlar (7). Yazarların çalıştığı merkez, hastalarının büyük çoğunluğunu KBY'li hastaların oluşturduğu 289 yataklı bir eğitim ve araştırma hastanesidir. Özellikle bu hasta grubunda gelişen stafilokok enfeksiyonlarının tedavisi amacıyla yılda yaklaşık 5000 gram vankomisin kullanılmaktadır (hastane eczanesi verisi). *Vancomycin-intermediate S. aureus* enfeksiyonu açısından risk grubunda bulunan hastalarda çok miktardaki vankomisin kullanımına karşın bu çalışma sonucunda vankomisine azalmış duyarlılık gösteren MRSA veya MSSA suşuna rastlanmamıştır.

Rutin laboratuvar ortamında vankomisine azalmış duyarlılık gösteren stafilocok suşlarını saptamak için hangi yöntemin kullanılacağı konusu önem taşımaktadır. Zira bugüne kadar saptanan VISA suşlarının tamamı, rutinde en sık kullanılan yöntem olan disk difüzyon yönteminde duyarlı bulunmuştur (9). Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control-CDC) (6)'nin rutin laboratuvarlar için önerdiği yöntem; stafilocokların kanlı agarda 24 saatlik inkübasyonu sonrasında gelişen kolonilerinden hazırlanan 0.5 McFarland yoğunluktaki süspansiyonlardan 10 mL'lik bir örneğin tarama besiyeri olarak kullanılan 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA'a inoküle edilmesi ve 35° C'de tam 24 saat inkübasyondan sonra üreme açısından değerlendirilmesidir.

Yapılan bazı çalışmalar, BHIA'nın laboratuvarında hazırlanırken standardizasyonunun zor olduğunu, kullanılan BHIA kutularının önemli farklılıklara yol açtığını, bu nedenle vankomisin içeren hazır (ticari) BHIA kullanılması gerektiğini öne sürüyorsa da, bu çalışmada, laboratuvarında hazırlanan BHIA her defasında dirençli kontrol suşunun üremesine izin verdiği ve duyarlı kontrol suşunun üremesini engellediğinden güvenilir bulunmuştur (9, 14, 15).

Bu çalışma sonucunda, VISA enfeksiyonu açısından risk grubunda bulunan hastalarda çok miktardaki vankomisin kullanımına karşın vankomisine azalmış duyarlılık gösteren MRSA veya MSSA suşuna rastlanmamış olması sevindiricidir.

KAYNAKLAR

1. **Centers for Disease Control and Prevention.** Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States 1997. *MMWR* 1997; 46: 813-5.
2. **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: 135-46.
3. **Centers for Disease Control and Prevention.** *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin: Illinois, 1999. *MMWR* 2000; 48: 1165-7, 2000.
4. **Marlowe EM, Cohen MD, Hindler JF, Ward KW, Bruckner DA.** Practical strategies for detecting and confirming vancomycin-intermediate *S. aureus*: A tertiary-care hospital laboratory's experience. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2637-9.
5. **Kim M, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K.** Vancomycin-intermediate *S. aureus* in Korea. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3879-81.
6. **Centers for Disease Control and Prevention.** Laboratory capacity to detect antimicrobial resistance. *MMWR* 1998; 48: 1167-71.
7. **Fridkin SK.** Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: What the infectious disease specialist needs to know. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 108-15.
8. **Dubreux SB, Reverdy ME, Nervi C, et al.** Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *S. aureus* susceptible to methicillin and *in vitro* selection of a vancomycin-resistant derivative. *Antimicrob Agent Chemother* 2001; 45: 349-52.
9. **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.
10. **Başustaoglu A.** Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Glikopeptidlere direnç. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi* 2001; 5: 202-9.
11. **Daum RS, Gupta R, Sabbagh R, Milewski WM.** Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin: isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. *J Infect Dis* 1992; 166: 1066-72.
12. **Anonymous.** *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States 2002. *MMWR* 2002; 51: 565-7.
13. **Anonymous.** Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* - Pennsylvania, 2002. *MMWR* 2002; 51: 902-3.
14. **Hubert SK, Mohammed JM, Fridkin SK, Gaynes RP, McGowan JE, Tenover FC.** Glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* Evaluation of a novel screening method and results of a survey of selected U. S. hospitals. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3590-3.
15. **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.